

Rec'd PCT/PTO 03 MAR 2005

PCT/JP 03/11329 #2

05.09.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 9月 5日

出願番号
Application Number: 特願2002-260515
[ST. 10/C]: [JP 2002-260515]

出願人
Applicant(s): 株式会社生物技術研究所

REC'D 23 OCT 2003

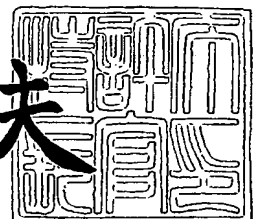
WIPO PCT

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 M-14-006

【提出日】 平成14年 9月 5日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/02

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府富田林市若松町東1丁目9番32号 株式会社
生物技術研究所内

【氏名】 勝山 巖

【発明者】

【住所又は居所】 アメリカ合衆国 93012 カリフォルニア州、
カマリロ、ワン・ユニバーシティ・ドライブ、カリフォルニア州立大学・チャネル・アイランズ、S & Tビルディング アライアンス・プロテイン・ラボラトリーズ
内

【氏名】 荒川 力

【発明者】

【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21番24号 鹿児島大
学農学部内

【氏名】 徳永 正雄

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金台4丁目6番1号 東京大学医科学研
究所内

【氏名】 山本 雅

【特許出願人】

【識別番号】 301009597

【氏名又は名称】 株式会社生物技術研究所

【代理人】

【識別番号】 100095832

【弁理士】

【氏名又は名称】 細田 芳徳

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050739

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生理活性物質のスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に關与するタンパク質またはその断片を発現可能であり、かつ該タンパク質またはその断片の非発現下と比べて発現下に生育阻害が認められる形質転換酵母。

【請求項 2】 該タンパク質またはその断片が、少なくとも該タンパク質の活性部位を活性のある状態で保持してなるものである、請求項 1 記載の形質転換酵母。

【請求項 3】 該タンパク質が、Tob ファミリーに属するタンパク質および／またはCaf ファミリーに属するタンパク質である、請求項 1 または 2 記載の形質転換酵母。

【請求項 4】 Tob ファミリーに属するタンパク質が、そのアミノ酸配列の N 末端領域に、

- (a) 配列番号：1 のアミノ酸配列を有するタンパク質、
 - (b) 配列番号：1 のアミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、
 - (c) 配列番号：1 のアミノ酸配列との配列同一性が20%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、または
 - (d) N 末端から 100 アミノ酸残基までの領域において配列番号：2 のアミノ酸配列との配列同一性が20%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、
- である、請求項 3 記載の形質転換酵母。

【請求項 5】 Caf ファミリーに属するタンパク質が、

- (a) 配列番号：4 のアミノ酸配列を有するタンパク質、
- (b) 配列番号：4 のアミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって

、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、または、

(c) 配列番号：4のアミノ酸配列との配列同一性が20%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、

である、請求項3記載の形質転換酵母。

【請求項6】 プロモーターに発現可能に連結された該タンパク質またはその断片をコードする遺伝子を含む請求項1～5いずれか記載の形質転換酵母。

【請求項7】 a) 請求項1～6いずれかに記載の形質転換酵母と被験試料とを接触させる工程、

b) ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質またはその断片を発現しうる条件下に酵母を培養する工程、ならびに

c) 酵母の生育状態を測定する工程、
を含み、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育状態の回復が認められた場合に該被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する、生理活性物質のスクリーニング方法。

【請求項8】 工程c)において酵母の生育状態を、酵母培養液の濁度変化、酵母の形態変化、酵母の湿重量変化、酵母の乾燥重量変化、酵母の内因性酵素活性変化または酵母の内因性タンパク質量変化をモニターすることにより測定する、請求項7記載のスクリーニング方法。

【請求項9】 請求項7または8に記載のスクリーニング方法により得られる生理活性物質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞の増殖や分化に作用しうる生理活性物質のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

これまでに細胞周期調節に関与する種々の因子が報告され、その機能が徐々に明らかにされつつある。たとえば、Tob ファミリーという一群のタンパク質が知られており、該タンパク質をコードする遺伝子として、現在までに6種類のメンバーがホ乳類で見出されている（たとえば、非特許文献1参照）。たとえば、Tob を培養細胞に強制発現させると細胞増殖抑制を示すことが報告されている（たとえば、非特許文献2参照）。この細胞増殖抑制の正確な分子メカニズムは不明であるが、Tob は細胞周期のG0/G1期停止およびG2/M 期停止の両方に関与しているものと考えられ、該タンパク質は転写因子のコファクターとして機能することが示唆されている。また、tob 遺伝子欠損マウスでは骨量が増加することが知られている（たとえば、非特許文献3参照）。Tob は、細胞内シグナル伝達分子であるSmadに結合して骨形成因子（BMP）シグナルを抑制し、BMP 依存的な骨芽細胞の増殖および分化を抑制して骨形成を制御していることが明らかにされている（たとえば、非特許文献4参照）。

【0003】

また、Caf ファミリーという一群のタンパク質が知られている。このタンパク質は酵母を含むすべての真核生物に存在する。たとえば、Caf1はCCR（carbon catabolite repressor）4と結合して細胞周期に影響を与えることが報告されている（たとえば、非特許文献5および6参照）。また、Caf 1はTob と相互作用することが知られており、2つの因子が相互作用することによって細胞周期においてG0期からG1期への移行にブレーキをかけている可能性が考えられている。tob 遺伝子をノックアウトしたマウスでは癌の発生率が優位に増加することが報告されている（たとえば、特許文献1参照）。

【0004】

【非特許文献1】

吉田富, 山本雅(2001)実験医学, 19, 1194-1198

【非特許文献2】

Suzuki, T., K-Tsuzuku, J., Ajima, R., Nakamura, T., Yoshida, Y., and Yamamoto, T. (2002) Genes Dev., 16, 1356-1370

【非特許文献3】

Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa, O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T., Miyazono, K., Noda, M., Noda, T., and Yamamoto, T. (2000) Cell, 103, 1085-1097

【非特許文献 4】

Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa, O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T., Miyazono, K., Noda, M., Noda, T., and Yamamoto, T. (2000) Cell, 103, 1085-1097

【非特許文献 5】

Chen, J., Rappsilber, J., Chiang, Y. C., Russell, P., Mann, M., Denis, C. L., J. Mol. Biol. (2001) 314, 683-94

【非特許文献 6】

Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, Y. C., Collart, M. A., Liu, H. Y., and Denis, C. L., Mol. Cell. Biol. (1999) 19, 6642-6651

【特許文献 1】

特開2001-211782 号公報 (第2 頁)

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

以上のような細胞周期調節に関与する因子、特にTob ファミリータンパク質やCaf ファミリータンパク質等のホ乳類のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与する因子と同様な機能または該機能を阻害もしくは増大する機能を有する生理的に活性な物質は、細胞の増殖や分化に関与する種々の疾患の予防剤および／もしくは治療剤となる可能性がある。たとえば、Tob の機能を阻害する物質は骨粗鬆症や骨折などの骨疾患の予防剤および／もしくは治療剤となる可能性があり、Caf1 と相互作用してTob と同様の作用を発揮する物質は発癌予防剤および／もしくは抗癌剤となる可能性がある。

【0006】

従って、本発明は、かかる生理活性物質のスクリーニング方法を提供すること

を目的とする。また、当該方法に好適に使用される形質転換酵母、ならびに該スクリーニング方法により得られうる生理活性物質を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

すなわち、本発明は、

〔1〕 ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に關与するタンパク質またはその断片を発現可能であり、かつ該タンパク質またはその断片の非発現下と比べて発現下に生育阻害が認められる形質転換酵母、

〔2〕 該タンパク質またはその断片が、少なくとも該タンパク質の活性部位を活性のある状態で保持してなるものである、前記〔1〕記載の形質転換酵母、

〔3〕 該タンパク質が、Tob ファミリーに属するタンパク質および／またはCaf ファミリーに属するタンパク質である、前記〔1〕または〔2〕記載の形質転換酵母、

〔4〕 Tob ファミリーに属するタンパク質が、そのアミノ酸配列のN 末端領域に、

(a) 配列番号：1 のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(b) 配列番号：1 のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、

(c) 配列番号：1 のアミノ酸配列との配列同一性が20%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、または

(d) N 末端から100アミノ酸残基までの領域において配列番号：2 のアミノ酸配列との配列同一性が20%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、

である、前記〔3〕記載の形質転換酵母、

〔5〕 Caf ファミリーに属するタンパク質が、

(a) 配列番号：4 のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(b) 配列番号：4 のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸残基の欠

失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、または、

(c) 配列番号：4 のアミノ酸配列との配列同一性が20%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、

である、前記〔3〕記載の形質転換酵母、

〔6〕 プロモーターに発現可能に連結された該タンパク質またはその断片をコードする遺伝子を含むしてなる前記〔1〕～〔5〕いずれか記載の形質転換酵母、

〔7〕 a) 前記〔1〕～〔6〕いずれかに記載の形質転換酵母と被験試料とを接触させる工程、

b) ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質またはその断片を発現しうる条件下に酵母を培養する工程、ならびに

c) 酵母の生育状態を測定する工程、

を含み、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育状態の回復が認められた場合に該被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する、生理活性物質のスクリーニング方法、

〔8〕 工程c)において酵母の生育状態を、酵母培養液の濁度変化、酵母の形態変化、酵母の湿重量変化、酵母の乾燥重量変化、酵母の内因性酵素活性変化または酵母の内因性タンパク質量変化をモニターすることにより測定する、前記〔7〕記載のスクリーニング方法、ならびに

〔9〕 前記〔7〕または〔8〕に記載のスクリーニング方法により得られうる生理活性物質、
に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の形質転換酵母は、ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質またはその断片を発現可能であり、かつ該タンパク質またはその断片を発現していない状態（非発現下）と比べて発現している状態（発現下）で

生育阻害が認められるという性質を有する。

【0009】

本明細書にいう「ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質（以下、シグナルタンパク質という）」とは、ホ乳類細胞における細胞周期のうちG0期からG1期およびG1期からS期に至る過程に関与し、その進行または停止を制御する機能を有するタンパク質をいう。また、「生育阻害が認められる」とは、シグナルタンパク質またはその断片の非発現下および発現下での酵母の増殖曲線を得、それぞれの世代時間を求め、それらを対比した場合に、非発現下に比べて発現下に酵母の世代時間が長くなることをいう。また、世代時間の代わりに増殖速度を求めてもよい。その場合、対数増殖期の増殖曲線の傾きが小さくなることをいう。増殖曲線は酵母の培養時間に対して増殖の程度を示す任意のパラメータ（たとえば、後述の酵母培養液の濁度等）の値をプロットすることにより作成する。本発明の形質転換酵母の性質の具体的な評価方法については後述する。「ホ乳類細胞」とはホ乳類に由来する細胞であればよく、たとえば、ヒト、サルなどの霊長類、マウス、ラット、モルモットなどのげっ歯類、ウシ、ブタなどの偶蹄類、ネコなどの食肉類、ゾウなどの長鼻類、ウマなどの奇蹄類、家兎などのウサギ類、コウモリなどの翼手類、カンガルー、ワラビーなどの有袋類、カモノハシ、ハリモグラなど単孔類等由来の細胞が挙げられる。

【0010】

シグナルタンパク質としては、たとえば、Tobファミリーに属するタンパク質、Cafファミリーに属するタンパク質、サイクリンファミリーに属するタンパク質、CDK(cyclin dependent kinase)ファミリーに属するタンパク質、Rb(retinoblastoma)ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、p53ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、p21ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、GADD45(growth arrest and DNA damage inducible)ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、E2Fファミリータンパク質に属するタンパク質、p15ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、p16ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、Arfファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、INK4ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、TGF β ファミリーに属するタンパク質、ヒストンジエステラーゼ類

等が挙げられる。

【0011】

Tob ファミリーに属するタンパク質は、そのアミノ酸配列のN 末端領域に、通常、配列番号：1 に示すアミノ酸配列と相同性をもつ約110 アミノ酸残基からなる相同性領域を有する。従って、当該タンパク質としては、①N 末端領域に配列番号：1 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、もしくは②該相同性領域を有するタンパク質が好ましい。前記②のタンパク質としては、その発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすものである限り、そのN 末端領域に、配列番号：1 のアミノ酸配列において少なくとも1 つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよく、また、配列番号：1 のアミノ酸配列との配列同一性が、好ましくは20%以上、より好ましくは35%以上、さらに好ましくは50%以上、さらに好ましくは65%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。

【0012】

さらに、Tob ファミリーに属するタンパク質の前記相同性領域には、N 末端から100アミノ酸残基までの領域に配列番号：2 に示すアミノ酸配列からなるBox A (GR Boxともいう) と呼ばれるさらに相同性の高い領域 (高度保存領域) が存在することが知られている。また、Tob ファミリーに属するタンパク質には、前記相同性領域に、当該Box A に加えて配列番号：3 に示すアミノ酸配列からなるBox B と呼ばれる高度保存領域の存在が知られているものもある。Box A およびBox B については、Tirone, F., (2001) J. Cell Physiol., 187, 155-165 を参照されたい。たとえば、Box A およびBox B の存在が知られているTob ファミリーに属するタンパク質について具体的にそれらのアミノ酸配列上の位置を示せば、hTobはN 末端から40～58位にBox A を76位～95位にBox B を有し、hTob2 はN 末端から40～58位にBox A を76位～96位にBox B を有し、Pc3 はN 末端から50～68位にBox A を124 位～143 位にBox B を有し、hAna はN 末端から42～60位にBox A を88位～117 位にBox B を有し、mBtg3 はN 末端から42～60位にBox A を88位～117 位にBox B を有し、hPc3B はN 末端から42～60位にBox A を88位～

117 位にBox B を有する。よって、Tob ファミリーに属するタンパク質としては、その発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすものである限り、N 末端から100 アミノ酸残基までの領域に配列番号：2 のアミノ酸配列との配列同一性が、好ましくは20%以上、より好ましくは35%以上、さらに好ましくは50%以上、さらに好ましくは65%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。

【0013】

Tob ファミリーに属するタンパク質としては、Box A およびBox B を共に有するものが好ましい。

【0014】

Caf ファミリーに属するタンパク質は、hCaf1 に代表される。hCaf1 は配列番号：4 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質である。Caf ファミリーに属するタンパク質としては、その発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすものである限り、配列番号：4 のアミノ酸配列において少なくとも1 つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよく、また、配列番号：4 のアミノ酸配列との配列同一性が、好ましくは20%以上、より好ましくは35%以上、さらに好ましくは50%以上、さらに好ましくは65%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。

【0015】

なお、前記「少なくとも1つ」とは1もしくは複数の意である。また、本明細書において「N 末端領域」という場合、当該領域はアミノ酸配列でN 末端から始まり、N 末端から400 残基までの領域をいう。

【0016】

アミノ酸配列の配列同一性とは、2つのアミノ酸配列間におけるアミノ酸残基の配列類似性をいう。配列同一性は、比較対象のアミノ酸配列の領域に渡って最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。

【0017】

配列同一性の数値（パーセンテージ）は、両方の配列に存在する同一のアミノ酸残基を決定して適合部位の数を決定し、次いで、比較対象の配列領域内のアミノ酸残基の総数で、前記適合部位の数を割り、得られた数値に100を乗ずることにより算出される。配列同一性は、配列解析ソフト、たとえば、BLASTP、FASTA等のネットワークサービスを利用して求めることができる。

【0018】

たとえば、Tob ファミリーに属するタンパク質としては、たとえば、Tob、Tob2、Btg1、Pc3/Tis21/Btg2、Ana/Btg3、B9.10、Pc3K、Pc3B、B9.15等が挙げられる。Caf ファミリーに属するタンパク質としては、たとえば、Caf1、Caf2、P0P2等が挙げられる。また、サイクリンファミリーに属するタンパク質としては、たとえば、サイクリンA、サイクリンB、サイクリンD1、D2、D3、サイクリンE等が挙げられる。

【0019】

本発明の形質転換酵母としては、発明の所望の効果の発現の観点から、少なくともその活性部位を活性のある状態で保持してなるシグナルタンパク質またはその断片を発現可能であるものが好ましい。本明細書において、シグナルタンパク質という場合、全長からなる完全タンパク質または1もしくは複数個のアミノ酸残基が欠失、付加等された実質的に完全なタンパク質をいい、その断片とはその一部分をいう。ここでいう「シグナルタンパク質の断片」とは、具体的にはシグナルタンパク質の活性部位を含む、好ましくは5残基以上、より好ましくは5～100,000残基、さらに好ましくは10～50,000残基、特に好ましくは100～10,000残基のアミノ酸からなるペプチドをいう。また、「活性部位」とは、シグナルタンパク質が細胞周期のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与する機能を発現するために必要な部位をいう。シグナルタンパク質の活性部位のアミノ酸配列上の位置および当該部位を構成するアミノ酸配列については未だ不明であるが、たとえば、Tobの活性部位は、前記相同性領域に存在するものと推定される。Tobの活性部位を構成すると推定される相同性領域のアミノ酸配列を配列番号：1に示す。「活性のある状態」とは、活性部位が活性発現に必要な高次構造を有してなる

ことをいう。シグナルタンパク質またはその断片が活性部位を活性のある状態で保持してなるものであるか否かについては、その発現下に形質転換酵母の生育阻害が生ずるか否かにより評価することができる。すなわち、形質転換酵母の生育阻害が生じた場合、発現したシグナルタンパク質またはその断片は活性部位を活性のある状態で保持してなるものである、と判定する。

【0020】

本発明の形質転換酵母としては、Tob ファミリーに属するタンパク質および／またはCaf ファミリーに属するタンパク質を発現可能なものが好ましく、中でもTob ファミリーに属するタンパク質およびCaf ファミリーに属するタンパク質の両方を共に発現可能なものがより好ましい。たとえば、Tob とCaf1を酵母において同時に発現させた場合、それらを各々単独で発現させる場合よりも酵母の生育阻害効果が増大する。それゆえ、Tob ファミリーに属するタンパク質およびCaf ファミリーに属するタンパク質の両方を共に発現させることにより、酵母の生育阻害をより明確に捉えることが可能であると考えられる。より具体的には、Tob ファミリーのタンパク質としてTob、Tob2、Btg1、Pc3/Tis21/Btg2、Ana/Btg3、B9.10、Pc3K、Pc3B、B9.15を、Caf ファミリーのタンパク質としてCaf1、Caf2、POP2を、また、Tob ファミリーのタンパク質とCaf ファミリーのタンパク質の組合せとして、ここに具体的に示すそれらのタンパク質の少なくとも1つずつの組合わせを発現可能な形質転換酵母が、本発明の所望の効果の発現の観点から、特に好ましい。

【0021】

本発明の形質転換酵母は、シグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を含有してなるベクター、好ましくは発現ベクターを酵母に導入することにより得られる。

【0022】

発現ベクターは、通常、プロモーター、シグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子およびターミネーターを含んでなる。該遺伝子はプロモーターに発現可能に連結される。ここで、「プロモーターに発現可能に連結される」とは、遺伝子にコードされるタンパク質の発現がプロモーターの制御下に誘導され

うるように該遺伝子が該プロモーターに連結されることをいう。また、該発現ベクターは、多くの場合、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、ならびに大腸菌で機能する複製起点を含んでなる。さらに、エンハンサーおよび酵母で機能する複製起点が含まれていてもよい。発現ベクターを構成するこれらの要素の配置関係は所望の効果を奏しうるように適宜決定することができる。

【0023】

このような発現ベクターは、たとえば、酵母ベクターとして知られるYIp 型、YEp 型、YRp 型、YCp 型の任意のプラスミドベクターにプロモーター、マルチクローニングサイト、ターミネーター等をこの順で導入した後、シグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子上流に翻訳開始コドン、下流に翻訳終止コドンが付加したものを前記マルチクローニングサイトに導入することにより構築することができる。このような組換え発現ベクターの構築には慣用の組換えDNA技術を利用できる（たとえば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等参照）。前記プラスミドベクターとしては、シグナルタンパク質の発現量が多量である方が好ましいという観点から、YEp 型のプラスミドベクターが望ましい。もしくはプラスミドベクターの宿主内保持安定性が高いという観点からYCp 型のプラスミドベクターが望ましい。当該ベクターとしては、たとえば、YEp24、YEp13 等が挙げられる。

【0024】

前記プロモーターとしては、たとえば、発現誘導可能なAOX1、GAL1、GAL7、GAL10、LAC4、PHO5、SUC2等のプロモーターが好適に使用される。また、非誘導型のADH、PGK等の解糖系の酵素のプロモーターを使用してもよい。ターミネーターは使用するプロモーターに応じて任意のものを選択すればよい。選択マーカー遺伝子として使用する抗生物質耐性遺伝子としては、たとえば、大腸菌用としてのアンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、酵母用としてのG418耐性遺伝子等が挙げられる。また、栄養要求性変異を相補する遺伝子としては、LEU2、URA3、TRP1、HIS4、ADE2等が挙げられる。

【0025】

また、本発明の発現ベクターの構築には、予めGAL1等のプロモーターが組み込まれた種々のベクターを利用することもできる。かかるベクターとしては、たとえばpESC Yeast Epitope Tagging Vectors (Stratagene社製) 等が挙げられる。さらに、酵母において発現されるシグナルタンパク質またはその断片にタグ付加を所望する場合においても、前記pESC Yeast Epitope Tagging Vectorsにはタグがついているのでそれを用いればよい。この場合、タグに特異的な抗体もしくは特異的な親和性を用いて目的タンパク質の検出および精製を行うことができるという利点がある。

【0026】

シグナルタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列についての情報は、たとえば、ジーンバンク (GenBank) より入手可能である。たとえば、Tob ファミリーに属するタンパク質およびCaf ファミリーに属するタンパク質をそれぞれコードする遺伝子について、以下に各遺伝子名と対応するアクセッション番号を例示する: tob (アクセッション番号: D38305 (ヒト) ; D78382 (マウス))、tob2 (アクセッション番号: AB035207 (ヒト) ; AB041225 (マウス))、btgl (アクセッション番号: X61123 (ヒト) ; L16846 (マウス) ; X64146 (G. domesticus))、pc3 /tis21 /btg2 (アクセッション番号: M60921 (ラット) ; M64292 (マウス) ; Y09943 (ヒト))、ana /btg3 (アクセッション番号: NM006806.1 (ヒト) ; Z72000 (マウス))、b9.10 (アクセッション番号: X73316 (X. levis))、pc3B (アクセッション番号: AJ271351.1 (ヒト) ; AJ005120 (マウス))、b9.15 (アクセッション番号: X73317 (X. levis))、caf1 (アクセッション番号: L46722 (ヒト) ; U21855 (マウス))、pop2 (アクセッション番号: D12807 (Saccharomyces cerevisiae))。また、pc3Kおよびcaf2については、Prevot, D., Morrel, A-P., Voeltzel, T., Rostan, M-C., Rimokh, R., Magaud, J-P., and Corbo, L. (2001) J. Biol. Chem., 276, 9640-9648およびBeko, Z., Sopiczki, M., and Carr, A.M. (1998) Mol. Gen. Genet., 260, 434-443を参照されたい。

【0027】

得られた塩基配列についての情報に基づいて一対のプライマーを作製し、鋳型

DNA として、たとえば、ヒトのゲノムDNA もしくはcDNAライブラリーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うことにより、シグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を適宜増幅することができる。

【0028】

Tob ファミリーもしくはCaf ファミリーに属するタンパク質として、前記する特定のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を所望する場合には、たとえば、当該アミノ酸配列をコードする遺伝子に対し公知のランダム変異導入法や部位特異的変異導入法により所望の変異を導入し、得られた遺伝子を酵母導入用の遺伝子として用いればよい。また、シグナルタンパク質の断片の発現を所望する場合には、たとえば、所望の断片をコードする遺伝子領域のみが増幅されるように適宜プライマーの配列を選択してPCR を行い、得られた遺伝子を酵母導入用の遺伝子として用いればよい。また、該断片の発現は、シグナルタンパク質をコードする遺伝子の任意の位置にストップコドンを導入して発現させる方法や制限酵素により所望の部分ペプチドに対応する遺伝子領域を切り出し、適切な発現ベクターに導入して発現させる方法等によっても行うことができる。

【0029】

通常、酵母の形質転換は1種のシグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を含有してなる1種の発現ベクターを用いて行えばよい。たとえば、tob もしくはcaf1を含有してなる1種の発現ベクターで酵母を形質転換する。他方、それぞれ1種のシグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を含有してなる2種以上の発現ベクターで、あるいは2種以上のシグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を含有してなる1種の発現ベクターで酵母を形質転換してもよい。たとえば、tob を含有してなる1種の発現ベクターとcaf1を含有してなる1種の発現ベクターとを用いて、あるいはtob とcaf1とが間接的に連結されてなる遺伝子部分を含有してなる1種の発現ベクター（以下、タンデム化発現ベクターという）で酵母を形質転換する。

【0030】

該タンデム化発現ベクターは、たとえば、以下のようにして得られる。たとえ

ば、単一の発現ベクター内において、*tob* および *caf1* の転写がそれぞれ別個のプロモーターによって制御を受けることができるように、*tob* 等の遺伝子とプロモーターとを当該ベクター内に配置する。なお、これらの方法において使用されるプロモーターやその他の要素等は前記と同様である。

【0031】

また、*tob* 等の遺伝子を相同組換えにより酵母の染色体へ挿入してもよい。たとえば、該染色体における該遺伝子の所望の標的挿入部位の両側にある2つの塩基配列に各々相同性を有する塩基配列からなるフランキング配列の間に *tob* 等の遺伝子を配置してなるベクターを用いて酵母を形質転換すればよい。標的挿入部位としては、当該部位に *tob* 等の遺伝子を挿入することで酵母の内因性プロモーターと該遺伝子とが発現可能に連結されうる部位が好ましい。かかる場合には、*tob* 等の遺伝子は、酵母の内因性プロモーターの制御下に発現可能となるため、形質転換に用いるベクター中、該遺伝子はプロモーターと発現可能に連結されている必要は必ずしもない。一方、ベクター中、*tob* 等の遺伝子を、たとえば、発現誘導型のプロモーターと発現可能に連結しておき、プロモーターと共に該遺伝子を染色体に挿入し、外部より発現制御可能となるようにしてもよい。このようなベクターの構築には、YIp 型ベクターのような組み込み型ベクターが好適に使用される。

【0032】

以上のようなベクターによる形質転換の対象とされる酵母としては、たとえば、Boone, Castenholz 著, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 第2版, Lippincott Williams and Wilkins 刊 (2000年) に酵母として記載されている微生物群が挙げられる。酵母の種類は特に限定されるものではないが、たとえば、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クルイペロマイセス属、ピキア属などの酵母が挙げられる。本発明においては、サッカロミセス属またはシゾサッカロミセス属に属する酵母を使用するのが好ましく、たとえば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) などを使用するのがより好ましい。なお、クルイペロマイセス属に属する酵母としては、たとえば、クルイペロマイセス・ラクテ

イス (*Kluyveromyces lactis*) が、ピキア属に属する酵母としては、たとえば、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) が挙げられる。

【0033】

前記のベクターによる酵母の形質転換は慣用の手法により行うことができる。たとえば、酢酸リチウム法 (Ito, H. et al., J. Bacteriol., 153, 163-168(1983))、電気穿孔法 (エレクトロポレーション法) (Hashimoto, H. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 21, 336-339(1985))、プロトプラスト法 (Hinnen, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929-1933(1978)) 等により、酵母を形質転換することができる。形質転換操作後、好ましくは選択マーカー遺伝子の性質に応じて常法により形質転換酵母を選抜する。得られた形質転換酵母はシグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を含むが、当該遺伝子を含むか否かについては、該酵母からDNAを抽出後、制限酵素を用いて、あるいはPCR法や公知の塩基配列決定法により確認することができる。本発明の形質転換酵母としては、本発明の所望の効果の発現の観点から、プロモーターに発現可能に連結された、シグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を含むものが好適である。

【0034】

得られた形質転換酵母が所望の性質を有する酵母であるか否かは、シグナルタンパク質またはその断片の発現条件下での形質転換酵母の生育阻害および該タンパク質等の発現を確認することにより評価することができる。具体的には、たとえば、後述の実施例1に記載の方法より評価することができる。なお、非誘導型のプロモーターを使用した場合には発現と非発現のオン・オフができないことから、かかる評価方法において非発現下にある酵母として、シグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を含まないベクターを用いる以外は本発明の形質転換酵母と同様の操作により得られた酵母を用いる。

【0035】

形質転換酵母は、たとえば、後述する本発明の生理活性物質のスクリーニング方法に使用するまでの間、適宜保存することが可能である。保存条件としては、菌体を液体培地に植菌して定常期に達するまで培養した後、培養液を集菌し、そ

の沈殿を10%グリセロール溶液に懸濁したものを-80℃のフリーザーにて保存する、という条件が好適である。

【0036】

本発明の形質転換酵母はシグナルタンパク質またはその断片を発現するが、その結果、生育阻害が生ずるという性質を有する。そのメカニズムについて詳細は未だ不明であるが、該シグナルタンパク質等が酵母の増殖および／または分化に関する調節機構に作用し生育阻害が生じているものと考えられる。

【0037】

本発明の形質転換酵母は、かかる性質を有することから、細胞の増殖や分化に関わる作用因子や、その作用メカニズムについての研究等において種々の用途が期待される。また、後述の本発明の生理活性物質のスクリーニング方法において好適に使用される。

【0038】

本発明の生理活性物質のスクリーニング方法は、本発明の形質転換酵母を、シグナルタンパク質またはその断片を発現可能な条件下、すなわち、生育阻害が生じうる条件下に培養し、その際、該酵母を被験試料と接触させ、被験試料が存在しない場合（非存在下）を対照として被験試料が存在する場合（存在下）に酵母の生育状態の回復が認められた時に、被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する、生理活性物質のスクリーニング方法である。なお、本明細書において「生理活性物質」とはホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に影響を与える化合物をいう。

【0039】

本発明の形質転換酵母では、前記するように、発現するシグナルタンパク質またはその断片が増殖および／または分化に関する調節機構に作用して生育阻害が生ずるものと考えられる。従って、被験試料の存在下に酵母を培養した際に生育状態の回復が認められた場合、被験試料中の成分がシグナルタンパク質等に結合し、該タンパク質等の作用に対し何らかの影響を与えているものと考えられる。たとえば、酵母で発現するシグナルタンパク質がTob の場合、被験試料を存在させることで酵母の生育状態が回復したならば、該被験試料中の成分はTob の機能

を阻害する可能性がある。また、たとえば、酵母で発現するシグナルタンパク質がTob およびCaf1の両者である場合、Caf1はTob と相互作用してその効果を発揮することが知られていることから、被験試料を存在させることで酵母の生育状態が回復したならば、該被験試料中の成分はCaf1と結合し得、Tob 様の作用を発揮する可能性がある。

【0040】

本発明の生理活性物質のスクリーニング方法は、具体的には、

- a) 前記形質転換酵母と被験試料とを接触させる工程、
- b) ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に参与するタンパク質またはその断片を発現しうる条件下に酵母を培養する工程、ならびに
- c) 酵母の生育状態を測定する工程、

を含むものである。そして、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育状態の回復が認められた場合に該被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する。

【0041】

該スクリーニング方法に使用される本発明の形質転換酵母には発現誘導型のプロモーターまたは非誘導型のプロモーターが使用される。以下においては、発現のオン・オフが可能で、シグナルタンパク質またはその断片の発現制御が容易な発現誘導型のプロモーターを使用して得られた形質転換酵母を用いる場合について説明する。

【0042】

被験試料としては特に限定されるものではないが、たとえば、化学的に合成された合成化合物、植物や動物の組織から得られた抽出物およびそれらから精製された化合物、微生物や植物・動物細胞の培養液およびそれらから抽出／精製された化合物等が挙げられる。該試料は適宜任意のバッファー等で希釈したものであってもよい。

【0043】

工程 a) において形質転換酵母を被験試料と接触させる方法は特に限定されるものではない。工程 b) ではシグナルタンパク質等を発現する条件下、すなわち

、生育阻害が生ずる条件下に形質転換酵母の培養（本培養）を行うが、本培養前にシグナルタンパク質等を発現しない条件下、すなわち、生育阻害が生じない条件下において該酵母を前培養し、種培養液を得、それを生育阻害が生ずる条件下にある培養液に添加して本培養を行う態様（態様1）では、形質転換酵母と被験試料との接触は、たとえば、種培養液を本培養のための培養液に添加する際に同時に被験試料を添加して行うのが好適である。また、本培養において形質転換酵母を数分から数時間程度培養した後、シグナルタンパク質等の発現を制御するプロモーターに応じた所定の成分を培地に添加して生育阻害が生ずる条件とする態様（態様2）では、たとえば、該成分を本培養のための培養液に添加する際に同時に被験試料を添加して形質転換酵母と被験試料とを接触させるのが好適である。

【0044】

前培養は、たとえば、形質転換酵母の培養に適した公知の培地に、適宜保存されていた形質転換酵母を接種して行う。培養は通常の酵母用培養条件、たとえば、24～37℃にて2～3日間、好氣的または嫌氣的条件下で行う。また、培養は、たとえば、フラスコ、試験管等で行えばよい。

【0045】

本培養も前培養と同様の条件で行うことができるが、前記態様1の場合には形質転換酵母が生育阻害を生ずる条件下にある培地を用いる。たとえば、シグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子がGAL1プロモーターの制御下に連結されている場合には、前培養に使用した培地にガラクトースを添加した培地を用いればよい。また、本培養は、多数の被験試料を同時に試験することができる等の理由から、マイクロタイタープレートのウエル中で行うこともできる。

【0046】

工程c)での酵母の生育状態の測定は、酵母の培養過程における菌体の増殖の程度の指標となる任意のパラメータを測定することにより行なう。酵母の生育状態の測定は、具体的には、たとえば、酵母培養液の濁度変化、酵母の形態変化、酵母の湿重量変化、酵母の乾燥重量変化、酵母の内因性酵素活性変化または酵母の内因性タンパク質量変化をモニターすることにより行うのが好ましいが、これ

らの方法に限定されるものではない。酵母培養液の濁度変化は、本培養の際に培養液の濁度を、たとえば、分光光度計により経時的に測定することによりモニターすることができる。同様に、酵母の形態変化は、たとえば、光学顕微鏡により経時的に酵母の形態を観察することによりモニターすることができる。酵母の湿重量変化は培養液を経時的に回収して集菌（たとえば、3,000rpmで10分間の遠心分離による）し、その重量を測定することにより、また、酵母の乾燥重量変化は集菌した酵母を乾燥（たとえば、105℃で4時間の維持による）後、その重量を測定することにより、それぞれモニターすることができる。酵母の内因性酵素活性変化のモニターは、たとえば、インペルターゼ、ヘキソキナーゼの活性を常法により経時的に測定することにより行うことができる。また、酵母の内因性タンパク質量変化のモニターは、生育段階によって発現量が変化しないタンパク質の量的変化をモニターすることが好ましく、たとえば、アクチンやURA3の量を当該タンパク質に特異的な抗体によるウェスタンブロッティングにより経時的に測定することにより行うことができる。なお、本発明の形質転換酵母の生育阻害は種々の原因により培養途中で外れる場合があるため、モニターは10～300時間行うのが好適であり、80～200時間行うのがより好適である。

【0047】

一方、対照として、工程 a) で酵母と被験試料とを接触させないこと以外は同様の操作を行い、同様に酵母の生育状態の測定を行う。

【0048】

次いで、得られた結果に基づき、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育状態の回復が認められるか否かについて評価する。評価は、得られた酵母の生育状態の測定結果を時間に対してプロットすることにより酵母の増殖曲線を得、被験試料と接触させた場合に得られた酵母の増殖曲線と対照の増殖曲線とを対比することにより行うのが好適である。具体的には、被験試料の存在下および非存在下での形質転換酵母の増殖曲線を得、それぞれ世代時間を求め、それらを対比し、被験試料の非存在下に比べて存在下に酵母の世代時間が短くなる場合、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育状態の回復が認められた、と評価する。また、世代時間の代わりに増殖速度を求め

てもよい。この場合、増殖速度が速くなった場合に、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育状態の回復が認められた、と評価する。なお、酵母の生育状態の測定を酵母の形態変化をモニターすることにより行った場合は、形態変化を起こした細胞数をヘマトメーター等でカウントすることにより増殖曲線を得る。

【0049】

以上の結果、被験試料の存在下に酵母の生育状態の回復が認められた場合、被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する。当該生理活性物質は本発明の形質転換酵母の生育状態を回復させる活性を有することから、該活性を指標として、さらに、所望により、たとえば、遠心分離、ろ過、液-液分配、吸着／溶出、クロマトグラフ、再結晶等を組み合わせ、公知の精製方法に従って該物質を単離することができる。

【0050】

また、本発明の一態様として、前記形質転換酵母を含んでなる生理活性物質のスクリーニング用キットを提供する。当該キットは本発明の生理活性物質のスクリーニング方法に好適に用いることができる。キットには、所望により、任意の培地、酵母の生育状態の測定に使用される種々の試薬（たとえば、タンパク質定量用試薬、形質転換用のプラスミドベクター、宿主の酵母、Tob 等の特異抗体、酵素活性定量試薬等）、および本発明の生理活性物質のスクリーニング方法を実施するための説明書等を含めてもよい。

【0051】

さらに、本発明は前記スクリーニング方法により得られうる生理活性物質を提供する。該生理活性物質は細胞周期の制御機構に作用しうると考えられることから、たとえば、細胞周期の制御機構の解明等の研究や細胞周期の制御機構の異常が発症や病態進行の原因のうちの少なくとも1つとなっている疾患等の治療または予防への使用が期待される。たとえば、Tob の機能を阻害する物質は骨粗鬆症や骨折などの骨疾患の治療剤となる可能性があり、Caf1と相互作用してTob と同様の作用を発揮する物質は抗癌剤となる可能性がある。

【0052】

該スクリーニング方法により、生理活性物質として、たとえば、チロシンキナーゼ阻害剤が得られうるが、かかる物質はタンパク質のチロシン残基のリン酸化を阻害するという機能を有しており、該阻害剤は、たとえば、チロシンキナーゼがかかわる過剰な細胞内シグナル伝達が病態の悪化の原因となっている疾患の治療薬、より具体的には制癌剤などとして使用されうる。

【0053】

本発明の生理活性物質を医薬製剤とする場合には、たとえば、経口または非経口投与に適した公知の有機または無機の担体、賦形剤、その他の添加剤を用いて常法に従って経口または非経口投与の固体状、半固体状または液状の製剤として調製できる。生理活性物質の投与量は、各物質の性質に応じ、所望の効果が得られうるように適宜調整すればよい。また、該製剤における生理活性物質の含有量は、その使用方法に応じて生理活性物質の所定量が投与できるようであれば特に限定されるものではない。

【0054】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はかかる実施例に限定されるものではない。

【0055】

実施例において使用した菌株、培地、試薬、ならびに一般的な実験方法を、以下にまとめて示す。

【0056】

1. 菌株

本実験で使用した菌株を表1に示す。

【0057】

【表 1】

表 1

菌	株	遺伝子型
<i>E.coli</i>	JM109	<i>hsdR17</i> (rK ⁻ ,mK ⁺) , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>) , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> ,F' [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^s</i> , <i>lacZ</i> Δ M15], <i>e14⁻</i> (<i>McrA⁻</i>)
<i>S.cerevisiae</i>	YPH500	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> ^{amber} , <i>ade2-101</i> ^{ochre} , <i>trp1-Δ63</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>leu2-Δ1</i>
<i>S.cerevisiae</i>	YNN27	<i>MATα</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3</i>
<i>S.cerevisiae</i>	20B-12	<i>MATα</i> , <i>trp1</i> , <i>pep4</i>
<i>S.cerevisiae</i>	INVSc1	<i>MATα</i> , <i>his3-Δ1</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1-289</i> , <i>ura3-52</i>

【0058】

2. 培地

培地は全てオートクレーブして用いた。各培地の組成については、酵母用の培地につきBurke, D., Dawson, D., Stearns, T. 著, Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics, 2000 年版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2000年) を、大腸菌用の培地につきSambrook et al., Molecular cloning a laboratory Manual: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989年) を参照のこと。

【0059】

(1) 大腸菌の培養には、以下の培地を用いた。

- ・ LB 液体培地
- ・ LB 固形培地
- ・ LB +Amp (アンピシリン) 培地 (Amp 濃度100 μ g/ml)

【0060】

(2) 大腸菌の形質転換には、以下の培地を用いた。

- ・ SOB培地
- ・ SOC培地

【0061】

(3) 酵母宿主の培養には、以下の培地を用いた。

- ・ YPD液体培地
- ・ YPD固形培地

【 0 0 6 2 】

(4) 酵母形質転換体の培養には、以下の培地を用いた。

- ・ CSM液体培地
- ・ CSM固形培地
- ・ CSM-TRP培地
- ・ CSM-URA培地
- ・ CSM-TRP-URA培地

【 0 0 6 3 】

3. 試薬

各試薬の組成については、酵母用につきBurke, D., Dawson, D., Stearns, T. 著, Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics , 2000 年版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2000年) を、大腸菌用につきSambook etal., Molecular cloning a laboratory Manual: A Laboratory Manual 2nd ed ., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989年) を参照のこと。

- ・ TB (Transformation Buffer)
- ・ 3M 酢酸ナトリウム (NaOAc) 溶液 (pH4.8)
- ・ グルコースバッファー (Glucose buffer)
- ・ 1%SDS-0.2N NaOH (プラスミド抽出用溶液 I I)
- ・ TE
- ・ 10 ×TBE
- ・ アクリルアミド：ビス (30:0.8)
- ・ 1.5M Tris-HClバッファー (pH8.8)
- ・ 0.5M Tris-HClバッファー (pH6.8)
- ・ サンプルバッファー (Sample buffer)
- ・ Electro-blotting バッファー
- ・ PBS
- ・ TPBS

- ・ 0.2M 酢酸リチウム (LiOAc) 溶液
- ・ 70 % ポリエチレングリコール (PEG)

【0064】

4. 実験方法

(1) 大腸菌JM109 の形質転換

-80℃で保存してあるJM109 のコンピテント細胞100 μ l を氷上で溶解し、5 μ l のプラスミドDNA を加えて氷上で30分間静置した。42℃、30秒間ヒートショックを行った後氷上で2 分間静置し、SOC 培地を0.9ml 加えてよく混合し、37℃で45分間培養した。それをAmp 濃度100 μ g/mlのLB+Amp 固形培地にまき、37℃で一夜培養した。

【0065】

(2) プラスミドDNA の中量調製法 (中量抽出)

30ml LB +Amp 液体培地で培養した菌体を遠心用チューブに移して室温で8000 rpm、5 分間遠心することによって集菌した。沈殿物に3ml のリゾチーム溶液(5 mg リゾチーム/1ml グルコースバッファー) を添加、緩やかに溶解した後、氷上に5 分間静置した。4ml のNaOH-SDS溶液(0.2N NaOH-1% SDS)を加えて緩やかに混合し、氷上に5 分間静置した。3ml の3M NaOAc溶液 (pH4.8) を加え、緩やかに混合し、氷上に10分間静置した後、15,000rpm、15分間、4℃で遠心を行った。上清を新しいチューブに移し、6ml のイソプロパノールを加えて-20℃に20分間静置した後、15,000rpm、15分間、4℃で遠心を行った。沈殿を2ml の70% エタノールで洗浄した後、300 μ l のTEに溶解してエッペンドルフ (登録商標) チューブに移し、同じく300 μ l のTEで遠心チューブを洗浄してエッペンドルフ (登録商標) チューブに移した (計600 μ l) 。6 μ l の10mg/ml RNase を加えて37℃で20分間インキュベートした後、フェノール抽出を3 回、クロロホルム抽出を3 回、エーテル抽出を3 回行った。120 μ l の5M NaCl 溶液と240 μ l の30% PEG# 6000を加えて混合した後-20℃で40分間静置し、4℃で30分間静置した。14000rpm、10分間、4℃で遠心した後、沈殿を回収してチューブの中の水分を完全に取り除き、80 μ l の滅菌水に溶解した。4.8 μ l の5M NaCl 溶液と192 μ l のエタノールを加えて混合し、-20℃で30分間静置した。14,000rpm、15分間、

4℃で遠心した後、沈殿に200 μ l の70%エタノールを加えて緩やかに沈殿を洗った。14,000rpm、15分間、4℃で遠心した後沈殿を吸引ポンプで乾燥し、100 μ l のTEに溶解した。その後、OD₂₆₀ 値及び電気泳動によって濃度を測定した。

【0066】

(3) PCR 法

98℃・30秒間、60℃・60秒間、72℃・90秒間のサイクルを25サイクルという条件で行った。5ng/ μ l のサンプルDNA 10 μ l に対し50 μ M のプライマーをそれぞれ5 μ l ずつ、NEB \times 10バッファーを10 μ l、4mM 4dNTP ミックスを10 μ l、NEB Vent pol(2U/ μ l)を0.5 μ l、滅菌水を59.5 μ l 加えて計100 μ l に調整し、それに10mg/ml のBSA を1 μ l、ミネラルオイルを60 μ l 加えて反応を行った。

【0067】

(4) アガロースゲルの切り出しによるDNA の単離

中量抽出によって調製したプラスミドDNA 5 μ g 分を100 μ l の系で制限酵素で処理後、Loading Dye 20 μ l を加えて120 μ l とした。電気泳動装置「ミューピッド(登録商標)」(株式会社アドバンス製)の6mmの幅のコーム3つを1つになるようにセロファンテープで巻き、0.7%のアガロースゲルを作製した。120 μ l のサンプルをゲルにアプライして泳動を行い、泳動終了後365nm 長波長DNA 切り出し用ランプをゲルにあてながらカッターナイフを用いて目的のバンドを切り出した。回収したゲルを250 μ l の0.5 \times TBE 入りの透析チューブに入れ、それをミューピッドにセットして通常方向に泳動を30分間行い、その後逆方向に泳動を30秒間行った。0.5 \times TBE を回収してフェノール抽出を2回、エーテル抽出を3回行った。

【0068】

(5) プラスミドDNA の小スケール調製法(ミニプレップ)

エッペンドルフ(登録商標)チューブに入った1.2ml LB+Amp 液体培地に形質転換した大腸菌のコロニーを接種し、37℃、一夜培養した。培養液を室温で12,000rpm、1分間遠心した後、100 μ l のグルコースバッファーを加えてボルテックスし、沈殿を完全に懸濁した。150 μ l のNaOH-SDS溶液(0.2N NaOH-1% SDS)を加え、チューブを上下に振って穏やかに混ぜた後、氷中に5分間静置した。150

μ l の3M酢酸カリウムバッファーを加えて混合した後、500 μ l のフェノールを加えて混合し、4℃で12,000rpm、5分間の遠心を行った。上層（約500 μ l 回収）を別のチューブに移し、等量（500 μ l）のクロロホルムを加えて4℃で12,000rpm、5分間の遠心を行った。上層（約400 μ l 回収）を別のチューブに移し、二倍量（800 μ l）のエタノールを加えてよく混ぜ、-20℃で30分間静置した後、4℃、14,000rpm、10分間の遠心を行い、沈殿に200 μ l の70% エタノールを加えて軽く混合した。4℃、14,000rpm、5分間の遠心を行い、沈殿を吸引ポンプで乾燥させた後、20 μ l のRNase 入りTE（10mg/ml RNase 1 μ l-TE 20 μ l）に溶解し、37℃で30分間インキュベートした。その後、取得したプラスミドDNA を制限酵素で処理し、電気泳動による確認を行った。

【0069】

（6）酵母の形質転換（酢酸リチウム法）

5ml のYPD 液体培地に酵母を植菌し、30℃、一夜の前培養を行った。培養液のうちの1ml を20ml のYPD 液体培地に植菌し、30℃で4～6時間、KU（Klett unit）値が60前後になるまで培養した。培養液のOD₆₀₀ 値を測定し、測定値から菌体数が 2×10^8 cells になるように培養液の量を計算して計りとり、50mlの遠心チューブに移した。室温で3000rpm、5分間の遠心を行った後、沈殿を10mlのTEに懸濁し、同様に室温で3000rpm、5分間の遠心を行った。沈殿を1ml のTEに懸濁して1ml の0.2M 酢酸リチウム溶液を加え、30℃で1時間培養した（コンピテント細胞作製終了）。作製したコンピテント細胞を200 μ l ずつ1.5ml のチューブに分注し、それにそれぞれ5 μ g 分のDNA を加え、氷上で30分間静置した。200 μ l の70%PEG4000 を加えてよく混合し、30℃で1時間インキュベートした後、42℃で5分間のヒートショックを行った。その後すぐに4℃、12,000rpm、5分間の遠心を行い、沈殿を前もって氷上で冷やしておいた1ml の滅菌水に懸濁した。4℃、12,000rpm、5分間の遠心を行い、沈殿を冷却した100 μ l の滅菌水に懸濁した後、CSM-TRP 固形培地にまき、30℃で3～5日間培養した。なお、KU値は、Klett Summerson 光電光度計（Klett Manufacturing 社製）により測定した。

【0070】

(7) SDS-PAGE- ウェスタンブロッティング

①タンパク質の調製 (アルカリ-TCA-SDS法)

5ml の培養液をエッペンドルフ (登録商標) チューブに移して14,000rpm、5分間遠心することによって集菌し、それを2、3回繰り返した。沈殿を1.25mlの滅菌水に懸濁し、160 μ l のMe-NaOHを加えて氷上に10分間静置した。14,000rpm、20分間遠心後、上清をピペットマンを用いて完全に除去し、沈殿に1.5mlの冷アセトンを加え、ボルテックスおよび超音波処理で菌体を完全懸濁にした。氷上に10分間静置した後、14,000rpm、5分間遠心して沈殿を回収し、エッペンドルフチューブのふたを開けてしばらく室温に静置し、アセトンをとばした (アセトン洗浄)。アセトン洗浄をもう一度行った後、沈殿を150 μ l の1% SDS/0.1M Tris-HCl バッファー (pH6.8) に溶解し、pH試験紙でpHが中性かアルカリ性であることを確認した後、超音波処理で沈殿を溶解した。95℃、3分間加熱した後、14,000rpm、5分間遠心して上清を回収し、Lowry法を用いてタンパク質の量を測定した。

【0071】

②Lowry 法

本法については、「Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275」に記載されている。はじめにBSA (ウシ血清アルブミン) を用いて標準曲線を作成した。BSAを10, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130 μ g/200 μ l になるようにそれぞれ調整し、そのサンプルに1mlのC液を入れてボルテックスし、室温に10分間静置した。0.1mlのLowry試薬を加え、ボルテックス、室温で30分間静置した後、OD₇₅₀とOD₅₀₀の値を測定し、得られた値から標準曲線を作成した。同様にして目的サンプルのOD₇₅₀とOD₅₀₀の値を測定し、標準曲線に照らし合わせてタンパク質の量を決定した。

【0072】

③ゲルの作製、準備および電気泳動

本法の実施には電気泳動装置MODEL BE-230 (BIO CRAFT 社製) を用いた。分離ゲルは7%と10%のものをそれぞれ用いた。ガラス平板、ガラスプレート、パッドを70%エタノールできれいにふき取った後、それらをクリップでとめ、分離ゲル

に10% APS (Ammonium Peroxodisulfate) を加えてプレートに流し込み、その上に1ml の滅菌水を流し込んだ。室温で30分間静置した後、滅菌水を捨てて残った水分をろ紙を用いて取り除いた後、濃縮ゲルに10% APS を加えてプレートに流し込み、コームを差し込んで室温で30分間静置した。分離ゲルおよび濃縮ゲルの組成はLaemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685, 1970 もしくは新生化学実験講座1. タンパク質 I 分離・精製・性質, 日本生化学会 編, 東京化学同人, 1997 に記載されている。

【0073】

作製したゲルのコームをはずし、小さい薬さじで残ったゲルをかきとり、コームの穴に残ったゲルを蒸留水で洗った。パッドをはずし、クリップで泳動層の上層と一緒に両端をとめ、泳動層の下層に泳動バッファーを入れて上層を下層にはめた。上層に新しい泳動バッファーを入れ、マーカースとサンプルをアプライした後、コードを接続して30mAの電流で泳動を行った。泳動終了後、クリップをはずして分離ゲルのみを回収してタッパーに移した。

【0074】

④ウエスタンブロッティング

Electro blottingバッファーにひたしたゲルと同じ大きさのろ紙6枚とニトロセルロース膜をウエスタンブロッティング用の電極板にろ紙3枚、ゲル、ニトロセルロース膜、ろ紙3枚の順に重ね、100mA で1時間、電流を流した。電流を流し終わった後、ニトロセルロース膜をプラスチックケースに移し、TPBS中で1時間振とうし(20分おきに液を交換)、5ml のTPBSに5 μ l の一次抗体を加えて1時間振とうした。TPBSで30分間振とうした後(10分おきに液を交換)、5ml のTPBSに5 μ l の2次抗体を加え、1時間振とうした。PBS で30分間振とうした後(10分おきに液を交換)、6mg の4-クロロ-1-ナフトールを2ml のメタノールに溶解し、10mlのPBS と5 μ l のH₂O₂を加えたものにニトロセルロース膜を入れ、手で振とうして発光させた。滅菌水で15~30分間振とうした後、ろ紙とアルミホイルに包んで保存した。

【0075】

実施例1 酵母*Saccharomyces cerevisiae* におけるtob (htob) 遺伝子の

発現 1

本実施例では *tob* 遺伝子を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YPH500 α 株に導入することにより菌体内において *Tob* タンパク質を発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、*tob* 遺伝子導入用プラスミドを構築し、構築したプラスミドを用いて酵母を形質転換して、その生育状態を観察した。

【0076】

なお、ベクターとして pESC-TRP をサブクローニングに使用した。また、*tob* 遺伝子は、該遺伝子を含む pME18S-*tob* (pME18S の *EcoRI* 部位に *tob* 遺伝子を挿入したもの) のものを増幅して用いた。

【0077】

(1) pESC-TRP- *tob* の作製

pME18S- *tob* を用いて大腸菌 JM109 の形質転換を行い、得られた形質転換体からプラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。同様に pESC-TRP についても大腸菌の形質転換を行い、プラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。調製したプラスミド pME18S- *tob* をテンプレートとし、
フォワードプライマー:

5'-cccggatcca tgcagcttga aatccaagta-3' (配列番号: 5)

リバースプライマー:

5'-cccgtcgacg ttagccataa caggctggaa-3' (配列番号: 6)

を用いて PCR を行い、*tob* 遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を *Bam*HI と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。pESC-TRP についても *Bam*HI と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。これらの実験操作によって回収した *tob* 遺伝子と pESC-TRP の断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。

【0078】

(2) YPH500 α 株における *Tob* タンパク質の発現および生育実験

作製したプラスミドを用いて酢酸リチウム法により YPH500 α 株の形質転換を行

った。得られた形質転換体を別のCSM-TRP 固形培地に植え継いで30℃で2～3日間培養し、それによってトリプトファン要求性を持つ形質転換体を選抜した。そのプレートから5mlのCSM-TRP Glc 液体培地にコロニーを植菌し、30℃で2～3日間振とう培養を行った。培養液0.1mlをそれぞれ2本の5ml CSM-TRP Gal 液体培地と1本のCSM-TRP Glc 液体培地に植え継ぎ、30℃で4～7日間振とう培養した。その間2時間おきにTob タンパク質が発現しているCSM-TRP Gal 液体培地のKU値を測定し、それにより酵母の生育状態を観察した。また、もう一方のCSM-TRP Gal 液体培地の培養液からタンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングを行うことにより、Tob タンパク質の発現を確認した。CSM-TRP Glc 液体培地に植菌した酵母を対数増殖期中期まで培養した後、5mlのCSM-TRP Gal 液体培地で洗浄し、懸濁した。それを30℃で数時間培養した後、タンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングを行った。

【0079】

(3) Tob タンパク質の発現によるYPH500 α 株の生育阻害の解析

酵母用のタンパク質発現ベクターであるpESCベクターはGAL1プロモーターを持ち、ガラクトースの存在下においてのみ目的遺伝子を発現させる。tob 遺伝子の発現によるYPH500 α 株の生育状態の変化を調べるためにまずグルコースの入った培地で前培養を行い、その後ガラクトースの入った培地に植えかえることによってtob 遺伝子を発現させ、該酵母の生育を調べた。

【0080】

実験方法としては、pESC-TRP、pESC-TRP- tob によるYPH500 α 株形質転換体をつまようじの先を用いて5mlのCSM-TRP Glc 液体培地に植菌し、30℃、170rpmで2～3日間振とう培養を行い、full growth まで培養した。その後、その培養液から100 μ l とって5mlのCSM-TRP Gal 液体培地に植菌し、同様の条件で5～7日間の培養を行った。2時間ごとにKU値を測定し、それぞれの酵母の生育状態について調べた。

【0081】

YPH500 α 株におけるtob 遺伝子の発現

YPH500 α 株について、培養時間に対してKU値をプロットし増殖曲線を作成した

。結果を図1に示す。

【0082】

なお、本明細書において図中、各プラスミド名は当該プラスミドにより形質転換した酵母の結果であることを示し、各プラスミド名の後の数字は当該プラスミドを用いて得られた別個の形質転換酵母であることを示す。

【0083】

ベクターのみであるpESC-TRPを導入した対照と比べ、tob 遺伝子の入ったpESC-TRP-tobを導入した場合に明らかに生育が悪かった。すなわち、pESC-TRP-1、2、8 に比べpESC-TRP-tob-6、11、15は、世代時間および増殖速度を求めた場合、世代時間が長くなり、増殖速度が小さくなることから、pESC-TRP-tob-6、11、15では生育状態が阻害されたと判定できる。この結果からYPH500 α 株におけるTobタンパク質の発現は酵母の生育を阻害することが分かる。ただし、tob 遺伝子が生育を抑えるのは培養を始めてから2、3日間くらいであり、120時間経過した段階では生育が対照であるベクターのみの場合に追いついてくるということも分かった。これはTobは酵母を死滅させるのではなく生育を抑える（生育速度が遅い）ので長時間培養によって定常期に到達し、対照の酵母の生育に追いつく、ということが考えられる。また、使用しているプラスミドは多コピーのプラスミドなので、その安定性については不明であることから、培養の段階でプラスミドが抜け落ち、それによってTobタンパク質の発現量が減ったため、ということも考えられる。また、培養の段階で自然突然変異が起こることによってTobタンパク質に強い酵母が現れ、それらだけが生き残ってまた増殖を続け、最終的に対照と同じレベルまで増殖が追いついたということも考えられる。Tobは非常に分解されやすいタンパク質なので、分解されることによって生育が回復した、ということも考えられる。

【0084】

以上の形質転換酵母を用いてさらに2回、また別の形質転換酵母を用いて同様の実験を行ったが、同様の生育阻害が観察された。

【0085】

また、前記同様の形質転換酵母を用いた別の実験で9時間、78時間、181時間

培養した時点で培養を止め、その培養液を用いてウェスタンブロッティングを行った。前培養のCSM-TRP Glc 液体培地から0.1ml ずつ別のCSM- TRP Glc液体培地1本ずつとCSM-Gal 液体培地2本ずつに植菌した。CSM- TRP Glc液体培地で定期的に達する直前まで培養し、集菌してCSM- TRP Gal液体培地で洗浄した後、CSM- TRP Gal液体培地に懸濁して9時間培養を行い、その培養液を用いてウェスタンブロッティングを行った。CSM- TRP Gal液体培地の1本を増殖曲線の作成に用い、もう1本を78時間培養した時点（生育に差がある時点）で培養を止め、ウェスタンブロッティングを行った。増殖曲線作成用に培養していた培養液を181時間培養した時点で培養を止め、ウェスタンブロッティングを行った。9時間培養した時点での結果を図2に、78時間培養した時点での結果を図3に、181時間培養した時点での結果を図4に示す。各場合、実験条件によりTob タンパク質が捉えられない場合があったが、いずれの酵母についてもいずれかの実験条件ではTob タンパク質が捉えられ、したがって実質的には全ての場合にTob タンパク質が捉えられたことになる。すなわち、ガラクトースを含んだ培地でTob を発現させ、生育に差がある時点でタンパク質を回収した場合にTob タンパク質が全てつかまった、という結果が得られた。なお、Tob タンパク質の検出にはTob 抗体（図2および4）及びmyc 抗体（図3）を用いた。myc 抗体とはTob タンパク質のC 末端に付与したmyc タグに対する特異的抗体である。

【0086】

実施例2 酵母*S. cerevisiae* におけるtob 遺伝子の発現2

実施例1と同様にして、*S. cerevisiae* YNN27株および20B-12株の形質転換体を各々得て、当該酵母の生育状態について調べた。

【0087】

それぞれの形質転換体について増殖曲線を作成した。結果を図5および図6に示す。これらの菌株では培養を始めてしばらくは生育に差が見られなかったが、YNN27 株で48時間頃から、20B-12株では24時間頃からわずかだが差が見られた。しかも今回は培養 を続けてもその差が縮まらず、持続して見られた。今回は前培養のCSM-TRP Glc 液体培地から0.1ml ずつ別のCSM-TRP Glc 液体培地とCSM-Gal 液体培地にそれぞれ植菌し、CSM-Gal 液体培地は増殖曲線の作成に用いた。CS

M-TRP Glc 液体培地をfull growthの手前まで培養し、集菌してCSM-Gal 液体培地で洗浄した後、CSM-Gal 液体培地に懸濁して5 時間培養を行い、その培養液を用いてウエスタンブロッティングを行った。また、Lowry 法によるタンパク質の定量は行わず、適当量のタンパク質をアプライした。YNN27 株についての結果を図7に、20B-12株についての結果を図8に示す（タンパク質の検出にはmyc 抗体を用いた）。結果から分かるように、tob 遺伝子が入った全てのサンプルに関してははっきりとタンパク質の発現が見られた。

【0088】

実施例3 形質転換酵母におけるプラスミドDNA の存在確認

実施例1で使用した酵母形質転換体にプラスミドが正しく組み込まれているかどうか確認するために、酵母のミニプレップを行った。それぞれのプラスミドについて3つの形質転換体について酵母のミニプレップを行い、それを大腸菌に形質転換して得られた形質転換体についてそれぞれ5つずつ大腸菌のミニプレップを行い、制限酵素で切断して確認を行った。つまり1つのプラスミドについて15個のサンプルについて調べた。5ml のYPD 液体培地に酵母の形質転換体を植菌し、30℃、一夜培養した後、8000rpm、5 分間の遠心を行った。沈殿を0.5ml の1M ソルビトール（pH 7.5）に溶解し、エッペンドルフ（登録商標）チューブに移した後、3.6 μ l の2-メルカプトエタノールと20 μ l の2.5mg/ml zymolyase 60,000を加え、37℃に60分間静置した。14,000rpm、20秒間遠心した後、沈殿を0.5ml の50mM Tris pH 7.4, 20mM EDTA に溶解し、50 μ l の10% SDSを加えてよく混合し、65℃に30分間静置した。0.2ml の5M酢酸カリウムを加え、氷上に1 時間静置した後、14,000rpm、5 分間の遠心を行った。上層を別のエッペンドルフ（登録商標）チューブに移し、同量のイソプロパノールを加えて混合し、室温に5 分間静置した。14,000rpm、10秒間の遠心を行った後、沈殿を70%エタノールで洗浄し、沈殿を乾燥させ、300 μ l のRNase を含むTEに溶解した。37℃に30分間静置した後、フェノール抽出を2 回、エーテル抽出を3 回を行い、エタノール沈殿を行った後、50 μ l のTEに溶解した。その後、調製したDNA 5 μ l を用いて大腸菌の形質転換を行い、得られた大腸菌の形質転換体からミニプレップによってプラスミドDNA を調製した。そして適当な制限酵素で切断した後、電気泳動によ

りプラスミドの確認を行った。pESC-TRPについての結果を図9に、pESC-TRP-tobについての結果を図10にそれぞれ示す。

【0089】

pESC-TRPについては、大腸菌のミニプレップを行った後、XbaIで切断してチェックした。その結果、それ以外は対照と同じ5.5kbと1.0kbのバンドの存在が確認できた。この結果から、pESC-TRPについてはほぼ完璧にプラスミドが酵母に形質転換されていることが確認できた。

【0090】

pESC-TRP-tobについては、大腸菌のミニプレップを行った後、SalIとBamHIで切断してチェックした。いくつか薄くて分かりづらいバンドがあるが、ほぼ全ての場合に対照と同じ6.5kbと1.2kbのバンドが確認できた。この結果から、pESC-TRP-tobについてもほぼ完璧にプラスミドが酵母に形質転換されていることが確認できた。

【0091】

実施例4 酵母*S. cerevisiae*におけるhcafl1遺伝子の発現1

本実施例ではhcafl1遺伝子を酵母*S. cerevisiae* YPH500 α 株に導入することにより菌体内においてCafタンパク質を発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、hcafl1遺伝子導入用プラスミドを構築し、構築したプラスミドを用いて酵母を形質転換して、その生育状態を観察した。

【0092】

なお、ベクターとしてpESC-URAをサブクローニングに使用した。また、hcafl1遺伝子は、該遺伝子を含むpcDNA3-hcafl1 (pcDNA3のBamHI-XhoI部位にhcafl1-myc遺伝子を挿入したもの)のものを増幅して用いた。

【0093】

(1) pESC-URA-hcafl1の作製

pcDNA3-hcafl1を用いて大腸菌JM109の形質転換を行い、得られた形質転換体からプラスミドDNAの調製(中量抽出)を行った。同様にpESC-URAについても大腸菌の形質転換を行い、プラスミドDNAの調製(中量抽出)を行った。調製したプ

ラスミドpcDNA3-hcaflをBamHI とXhoIで処理した後、ゲルからの切り出しによってDNA を回収した。pESC-URAについてもBamHI とXhoIで処理した後、ゲルからの切り出しによってDNA を回収した。これらの実験操作によって回収したhcafl 遺伝子とpESC-URAの断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミドDNA の調製（中量抽出）を行った。遺伝子導入部分の両側からシーケンスを行うことにより、導入遺伝子の塩基配列の確認を行った。

【0094】

(2) YPH500 α 株におけるCaf タンパク質の発現および生育実験

作製したプラスミドを用いて酢酸リチウム法によりYPH500 α 株の形質転換を行った。得られた形質転換体を別のCSM-URA 固形培地に植え継いで30℃で2 ～3 日間培養し、それによってウラシル要求性を持たない形質転換体を選抜した。そのプレートから5ml のCSM-URA Glc 液体培地にコロニーを植菌し、30℃で2 ～3 日間振とう培養を行った。培養液0.1ml をそれぞれ2 本の5ml CSM-URA Gal 液体培地と1本のCSM-URA Glc 液体培地に植え継ぎ、30℃で4 ～7 日間振とう培養した。その間2 時間おきにCaf タンパク質が発現しているCSM-URA Gal 液体培地のKU 値を測定し、それにより酵母の生育状態を観察した。また、もう一方のCSM-URA Gal 液体培地の培養液からタンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングを行うことにより、Caf タンパク質の発現を確認した。CSM-URA Glc 液体培地に植菌した酵母を対数増殖期中期まで培養した後、5ml のCSM-URA Gal 液体培地で洗浄し、懸濁した。それを30℃で数時間培養した後、タンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングを行った。

【0095】

(3) Caf タンパク質の発現によるYPH500 α 株の生育阻害の解析

酵母用のタンパク質発現ベクターであるpESCベクターはGAL1プロモーターを持ち、ガラクトースの存在下においてのみ目的遺伝子を発現させる。hcafl 遺伝子の発現によるYPH500 α 株の生育状態の変化を調べるためにまずグルコースの入った培地で前培養を行い、その後ガラクトースの入った培地に植えかえることによってhcafl 遺伝子を発現させ、該酵母の生育を調べた。具体的な実験方法は実施

例 1 と同様とした。

【0096】

YPH500 α 株における hcaf1 遺伝子の発現

YPH500 α 株についての生育状態の観察結果（増殖曲線）を図 11 に示す。全体的に見て対照のベクターを導入した酵母と hcaf1 導入酵母との間での生育の差は tob 遺伝子の場合ほど大きくはなかったが、同様に hcaf1 遺伝子を導入した酵母形質転換体で生育阻害が認められた。

【0097】

ウエスタンブロッティング用に培養していた CSM-URA Gal 液体培地を 70 時間培養した時点で培養を止め、アルカリ-TCA 法によりタンパク質を回収してウエスタンブロッティングを行った。また、同じくウエスタンブロッティング用に培養していた CSM-URA Glc 液体培地を対数増殖期中期まで培養した後、CSM-URA Gal 液体培地で洗浄し、懸濁した。その培地を 10 時間培養した後、タンパク質を回収してウエスタンブロッティングを行った。結果を図 12 に示す。7.5 % のアクリルアミドゲルに 50 μ g 分のタンパク質をアプライし、1 次抗体に myc 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。図から分かるように、ほぼ全てのサンプルにおいて Caf タンパク質がとらえられた。

【0098】

Tob のウエスタンブロッティングを行った際は Tob のバンド以外に菌体内のプロテアーゼによって分解された Tob のバンドが現れていたが、今回は Caf のバンドだけが得られた。これらの結果から Caf は非常に安定なタンパク質であると言える。これは動物細胞で行った実験においても同様の結果が示されており、酵母における実験において動物細胞と同じ傾向の結果が得られた。

【0099】

実施例 5 酵母 *S. cerevisiae* における hcaf1 遺伝子の発現 2

実施例 4 と同様にして酵母 *S. cerevisiae* INVSc1 株に hcaf1 遺伝子を導入し、生育を調べた。結果を図 13 に示す。YPH500 α 株と比べて Caf による生育阻害の度合いは少ないが、生育のばらつきがない、安定した結果が得られた。

【0100】

ウエスタンブロッティング用に培養していたCSM-URA Gal 液体培地を24時間培養した時点で培養を止め、アルカリ-TCA 法によりタンパク質を回収してウエスタンブロッティングを行った。結果を図14に示す。前回同様、50 μ g 分のタンパク質を7.5 %のゲルにアプライして電気泳動を行い、一次抗体にmyc 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。

【0101】

実施例6 酵母*S. cerevisiae* におけるtob 遺伝子とhcafl 遺伝子の同時発現

本実施例ではtob 遺伝子とhcafl 遺伝子とを酵母*S. cerevisiae* INVSc1 株に同時に導入することにより菌体内においてTob タンパク質とCaf タンパク質とを共に発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、以前構築したtob 遺伝子導入用プラスミドとhcafl 遺伝子導入用プラスミドとを用いて酵母を形質転換して、その生育状態を観察した。

【0102】

形質転換用ベクターとして、pESC-TRP-tob (pESC-TRPのBamHI-SalI部位にtob 遺伝子を挿入したもの) とpESC-URA-hcafl (pESC-URAのBamHI-XhoI部位にhcafl 遺伝子を挿入したもの) を用いた。

【0103】

(1) INVSc1株におけるTob タンパク質とCaf タンパク質の同時発現および生育実験

前記プラスミドを用いて酢酸リチウム法によりINVSc1株の形質転換を行った。得られた形質転換体を別のCSM-TRP-URA 固形培地に植え継いで30℃で2～3日間培養し、それによってトリプトファン要求性とウラシル要求性を合わせ持つ形質転換体を選抜した。そのプレートから5ml のCSM-TRP-URA Glc 液体培地にコロニーを植菌し、30℃で2～3日間振とう培養を行った。培養液0.1ml をそれぞれ2本の5ml CSM-TRP-URA Gal 液体培地に植え継ぎ、30℃で4～7日間振とう培養した。その間、数時間おきにTob タンパク質とCaf タンパク質が発現しているCSM-TRP-URA Gal 液体培地のKU値を測定し、それにより酵母の生育状態を観察した。また、もう一方のCSM-TRP-URA Gal 液体培地の培養液からタンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングを行うことにより、Tob タンパク質とCaf タンパク質

の発現を確認した。

【0104】

(2) Tob タンパク質とCaf タンパク質の同時発現によるINVSc1株の生育阻害の解析

酵母用のタンパク質発現ベクターであるpESC VectorsはGAL1プロモーターを持ち、ガラクトースの存在下においてのみ目的遺伝子を発現させる。tob 遺伝子とhcaf1 遺伝子の同時発現によるINVSc1株の生育状態の変化を調べるためにまずグルコースの入った培地で前培養を行い、その後ガラクトースの入った培地に植えかえることによってtob 遺伝子とhcaf1 遺伝子を同時発現させ、酵母の生育を調べた。

【0105】

INVSc1株におけるtob 遺伝子とhcaf1 遺伝子の同時発現

INVSc1株について、培養時間に対してKU値をプロットし増殖曲線を作成した。結果を図15に示す。

【0106】

前記のINVSc1株の実験でtob 遺伝子やhcaf1 遺伝子を単独で導入した場合と同様に対照と比べて生育の阻害が認められ、その程度は単独の場合よりも大きかった。

【0107】

ウエスタンブロッティングの結果を図16に示す。7.5% アクリルアミドゲルに50 μ g 分のタンパク質をアプライし、一次抗体にmyc 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。図から分かるように、Tob タンパク質とCaf タンパク質がそれぞれ明確にとらえられ、それぞれのタンパク質の発現が確認できた。

【0108】

配列表フリーテキスト

配列番号: 5 は、tob 遺伝子を増幅するためのプライマーの塩基配列である。

【0109】

配列番号: 6 は、tob 遺伝子を増幅するためのプライマーの塩基配列である。

【0110】

【発明の効果】

本発明により、ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に關与するタンパク質を 發現し得、かつ当該發現に伴って生育阻害が生じうる形質転換酵母が提供される。また、当該酵母を用いる生理活性物質のスクリーニング方法が提供される。前記酵母には、たとえば、細胞の増殖や分化に關わる作用因子や、その作用メカニズムについての研究等において種々の用途が期待される。また、前記生理活性物質のスクリーニング方法により、ホ乳類のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に關与する因子と同様な機能または該機能を阻害もしくは増大する機能を有する生理活性物質を得ることができる。当該生理活性物質は細胞の増殖や分化が關与する種々の疾患の治療剤および／または予防剤となる可能性がある。

【0111】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Biochemical and Pharmacological Laboratories Inc.

<120> A screening method for physiologically active substance

<130> M-14-006

<160> 6

【0112】

<210> 1

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Leu Glu Ile Gln Val Ala Leu Asn Phe Ile Ile Ser Tyr Leu

1

5

10

15

Tyr Asn Lys Leu Pro Arg Arg Arg Val Asn Ile Phe Gly Glu Glu Leu

20

25

30

Glu Arg Leu Leu Lys Lys Lys Tyr Glu Gly His Trp Tyr Pro Glu Lys

35

40

45

Pro Tyr Lys Gly Ser Gly Phe Arg Cys Ile His Ile Gly Glu Lys Val

50

55

60

Asp Pro Val Ile Glu Gln Ala Ser Lys Glu Ser Gly Leu Asp Ile Asp

65

70

75

80

Asp Val Arg Gly Asn Leu Pro Gln Asp Leu Ser Val Trp Ile Asp Pro

85

90

95

Phe Glu Val Ser Tyr Gln Ile Gly Glu Lys Gly Pro Val Lys Val Leu

100

105

110

Tyr Val Asp Asp Asn Asn Glu Asn Gly Cys Glu Leu Asp Lys Glu Ile

115

120

125

Lys Asn Ser Phe Asn Pro Glu Ala Gln Val

130

135

【 0 1 1 3 】

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Tyr Glu Gly His Trp Tyr Pro Glu Lys Pro Tyr Lys Gly Ser Gly Phe

1

5

10

15

Arg Cys Ile

【0114】

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu Pro Gln Asp Leu Ser Val Trp Ile Asp Pro Phe Glu Val Ser Tyr

1

5

10

15

Gln Ile Gly Glu Lys

20

【0115】

<210> 4

<211> 285

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Pro Ala Glu Thr Val Asp His Ser Gln Arg Ile Cys Glu Val Trp
1 5 10 15

Ala Cys Asn Leu Asp Glu Glu Met Lys Lys Ile Arg Gln Val Ile Arg
 20 25 30

Lys Tyr Asn Tyr Val Ala Met Asp Thr Glu Phe Pro Gly Val Val Ala
 35 40 45

Arg Pro Ile Gly Glu Phe Arg Ser Asn Ala Asp Tyr Gln Tyr Gln Leu
 50 55 60

Leu Arg Cys Asn Val Asp Leu Leu Lys Ile Ile Gln Leu Gly Leu Thr
65 70 75 80

Phe Met Asn Glu Gln Gly Glu Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Thr Trp Gln
 85 90 95

Phe Asn Phe Lys Phe Asn Leu Thr Glu Asp Met Tyr Ala Gln Asp Ser
 100 105 110

Ile Glu Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ile Gln Phe Lys Lys His Glu Glu
 115 120 125

Glu Gly Ile Glu Thr Gln Tyr Phe Ala Glu Leu Leu Met Thr Ser Gly
 130 135 140

Val Val Leu Cys Glu Gly Val Lys Trp Leu Ser Phe His Ser Gly Tyr
145 150 155 160

Asp Phe Gly Tyr Leu Ile Lys Ile Leu Thr Asn Ser Asn Leu Pro Glu

165

170

175

Glu Glu Leu Asp Phe Phe Glu Ile Leu Arg Leu Phe Phe Pro Val Ile

180

185

190

Tyr Asp Val Lys Tyr Leu Met Lys Ser Cys Lys Asn Leu Lys Gly Gly

195

200

205

Leu Gln Glu Val Ala Glu Gln Leu Glu Leu Glu Arg Ile Gly Pro Gln

210

215

220

His Gln Ala Gly Ser Asp Ser Leu Leu Thr Gly Met Ala Phe Phe Lys

225

230

235

240

Met Arg Glu Met Phe Phe Glu Asp His Ile Asp Asp Ala Lys Tyr Cys

245

250

255

Gly His Leu Tyr Gly Leu Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Val Gln Asn Gly

260

265

270

Thr Gly Asn Ala Tyr Glu Glu Glu Ala Asn Lys Gln Ser

275

280

【 0 1 1 6 】

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify tob gene

<400> 5

cccggatcca tgcagcttga aatccaagta

30

【0117】

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify tob gene

<400> 6

cccgtcgacg ttagccataa caggctggaa

30

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、tob 遺伝子を導入したYPH500 α 株形質転換体の増殖曲線を示す図である。

【図2】

図2は、9時間培養した時点でのtob 遺伝子を導入したYPH500 α 株形質転換体の培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図 3】

図 3 は、78 時間培養した時点での tob 遺伝子を導入した YPH500 α 株形質転換体の培養液のウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図 4】

図 4 は、181 時間培養した時点での tob 遺伝子を導入した YPH500 α 株形質転換体の培養液のウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図 5】

図 5 は、tob 遺伝子を導入した YNN27 株形質転換体の増殖曲線を示す図である。

【図 6】

図 6 は、tob 遺伝子を導入した 20B-12 株形質転換体の増殖曲線を示す図である。

【図 7】

図 7 は、tob 遺伝子を導入した YNN27 株形質転換体の培養液のウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図 8】

図 8 は、tob 遺伝子を導入した 20B-12 株形質転換体の培養液のウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図 9】

図 9 は、YPH500 α 株形質転換体における pESC-TRP の存在確認の結果を示すアガロースゲル電気泳動図である。

【図 10】

図 10 は、YPH500 α 株形質転換体における pESC-TRP-tob の存在確認の結果を示すアガロースゲル電気泳動図である。

【図 11】

図 11 は、hcafl 遺伝子を導入した YPH500 α 株形質転換体の増殖曲線を示す図である。

【図 12】

図 12 は、hcafl 遺伝子を導入した YPH500 α 株形質転換体の培養液のウェスタ

ンブロッティングの結果を示す図である。

【図 13】

図 13 は、hcaf1 遺伝子を導入したINVSc1株形質転換体の増殖曲線を示す図である。

【図 14】

図 14 は、hcaf1 遺伝子を導入したINVSc1株形質転換体の培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図 15】

図 15 は、tob 遺伝子とhcaf1 遺伝子を導入したINVSc1株形質転換体の増殖曲線を示す図である。

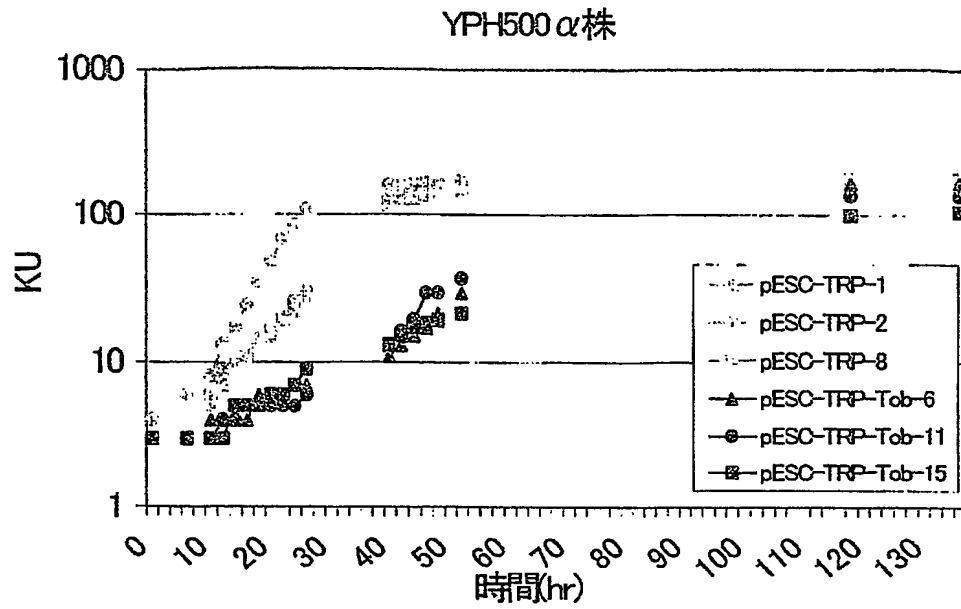
【図 16】

図 16 は、tob 遺伝子とhcaf1 遺伝子を導入したINVSc1株形質転換体の培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

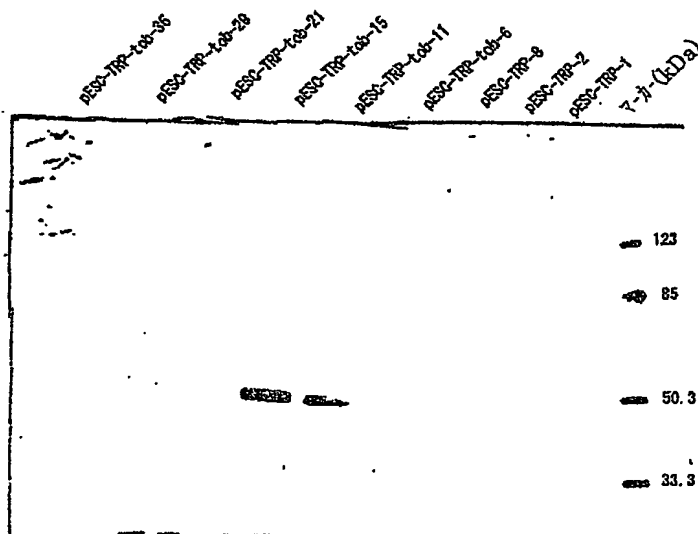
【書類名】

図面

【図 1】

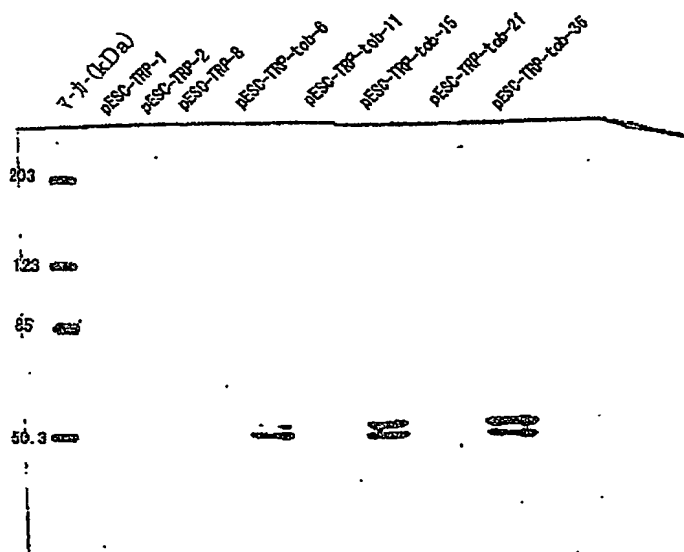


【図 2】

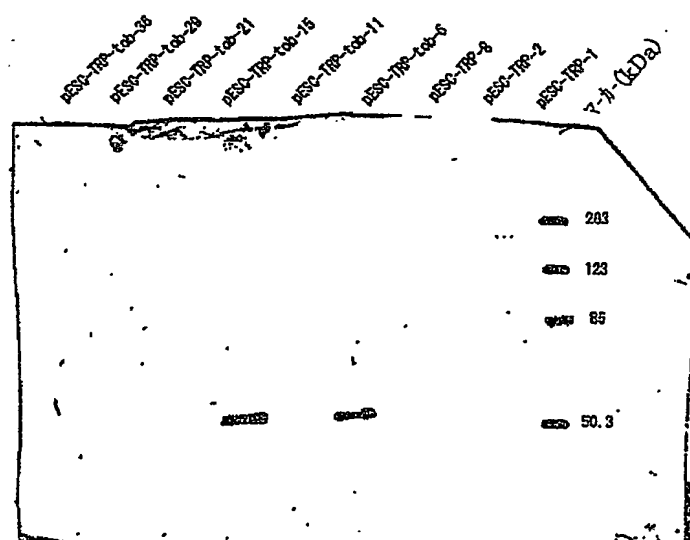


BEST AVAILABLE COPY

【図 3】

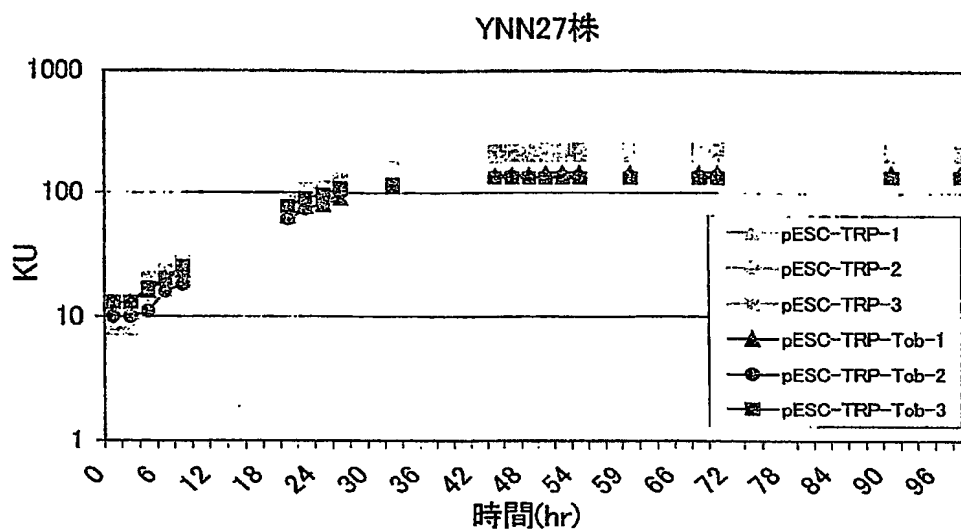


【図 4】

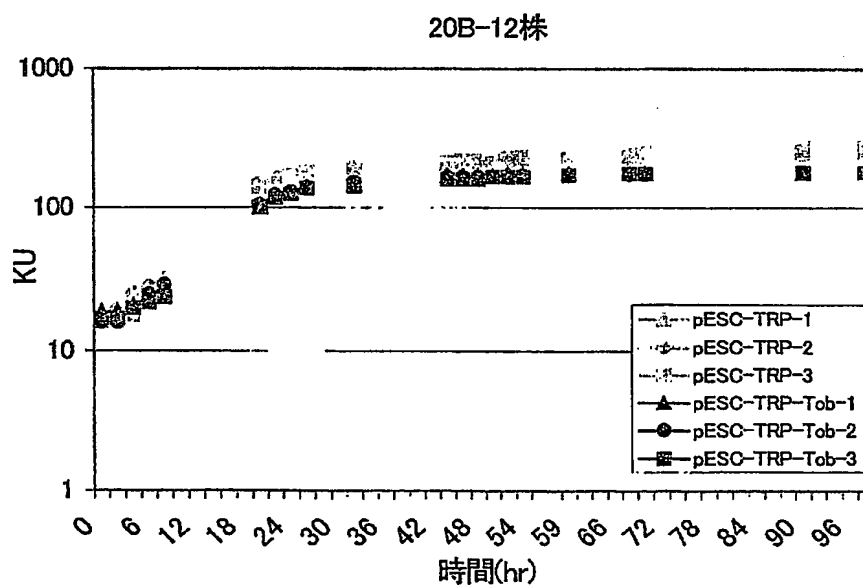


BEST AVAILABLE COPY

【図 5】

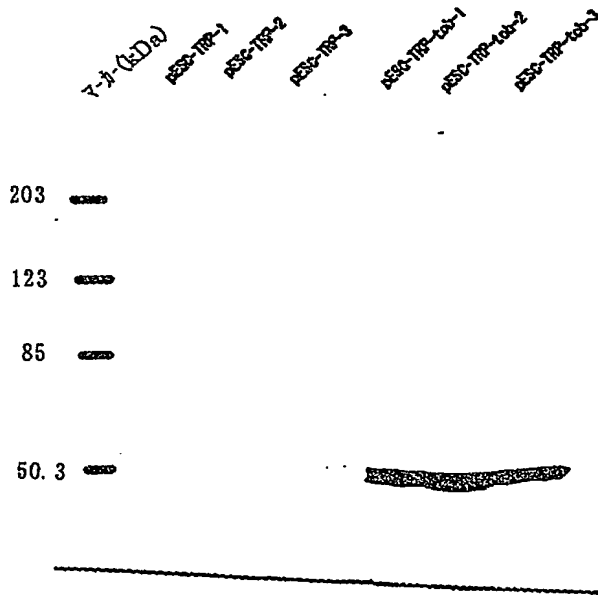


【図 6】

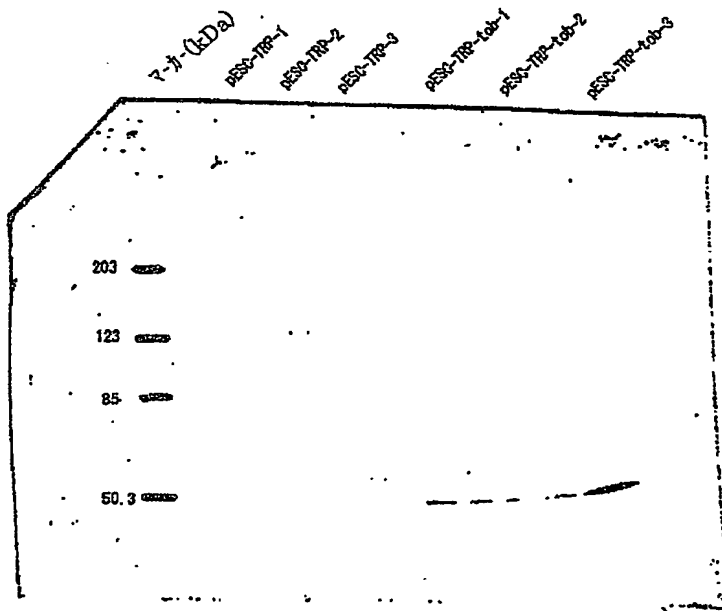


BEST AVAILABLE COPY

【図 7】

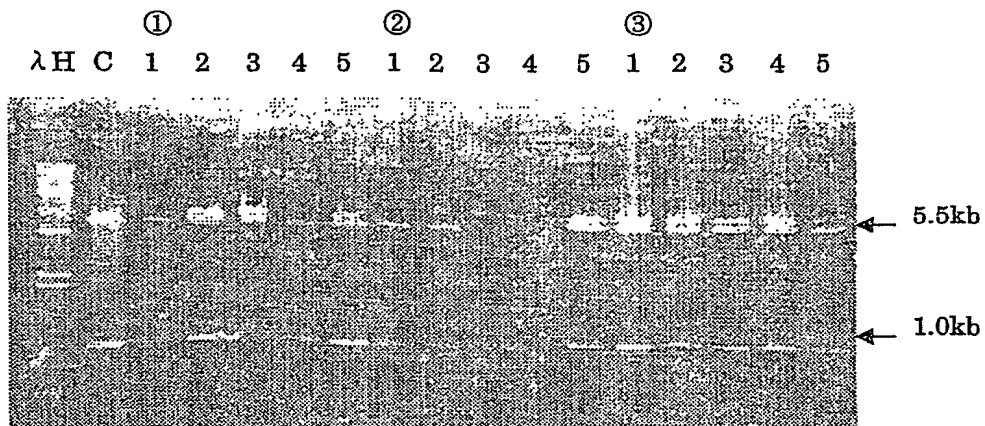


【図 8】

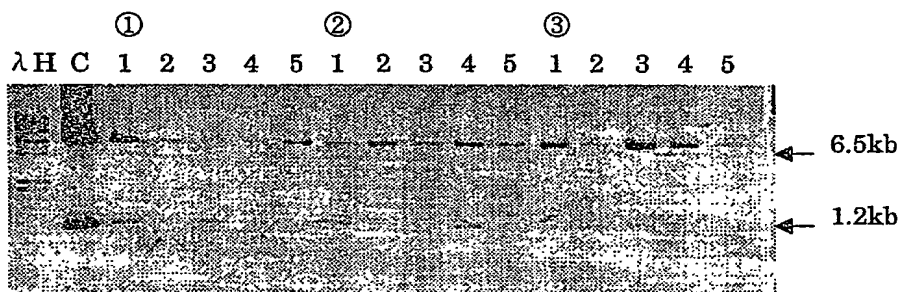


BEST AVAILABLE COPY

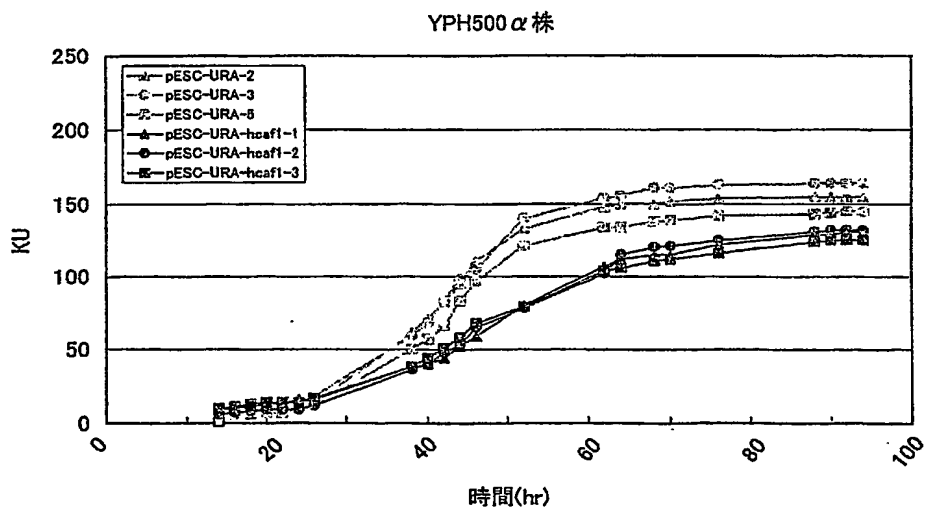
【図 9】



【図 10】

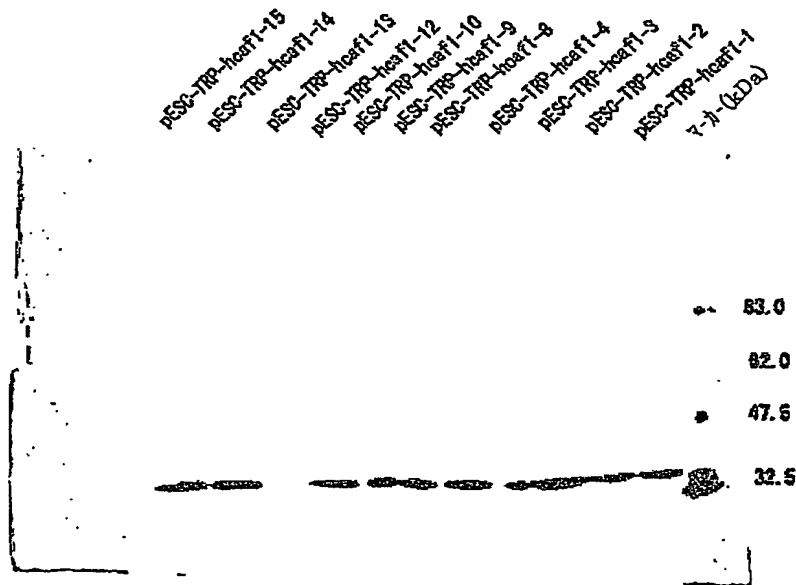


【図 11】

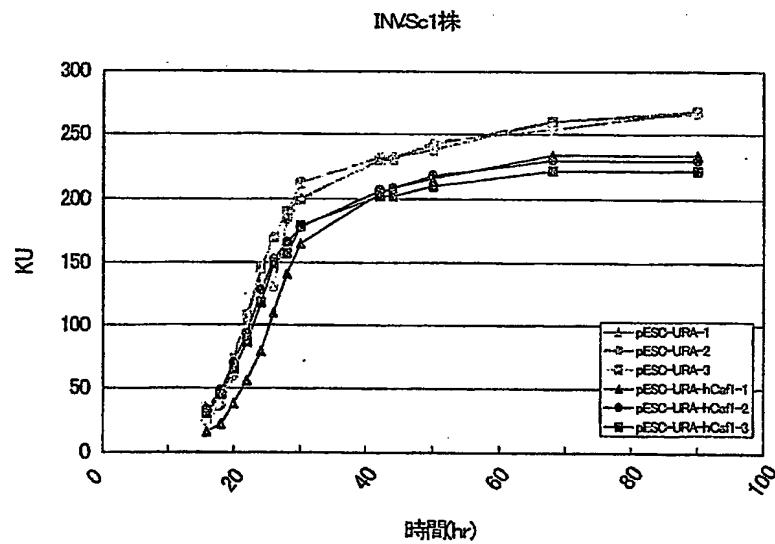


BEST AVAILABLE COPY

【図 12】

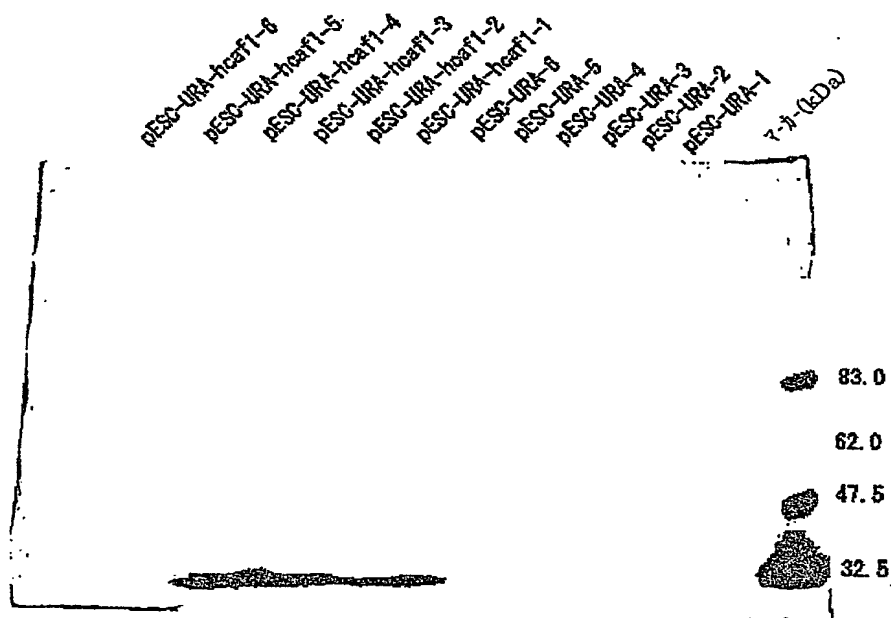


【図 13】

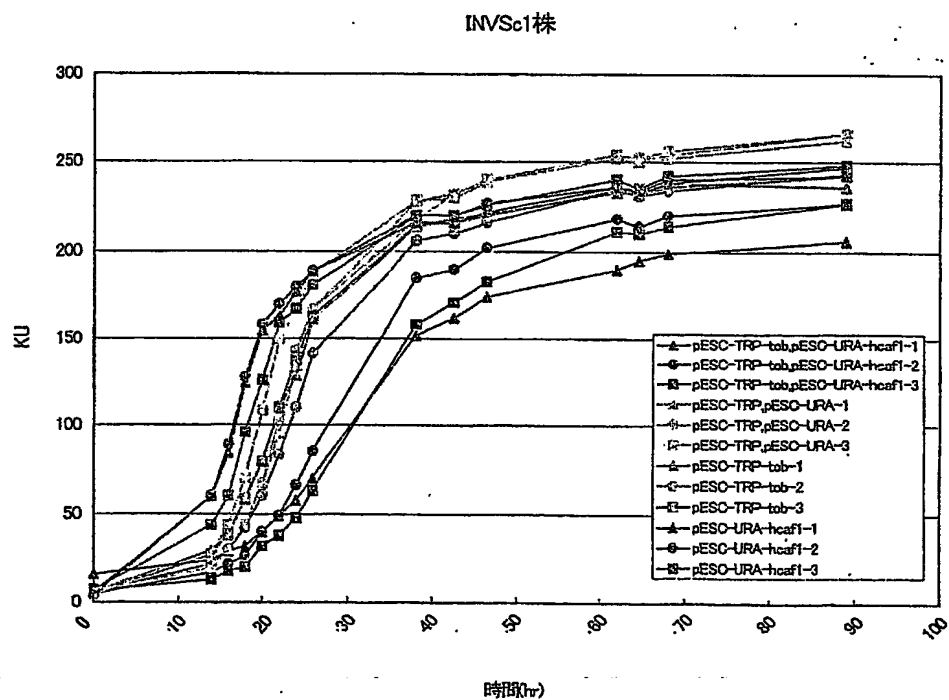


BEST AVAILABLE COPY

【図 14】

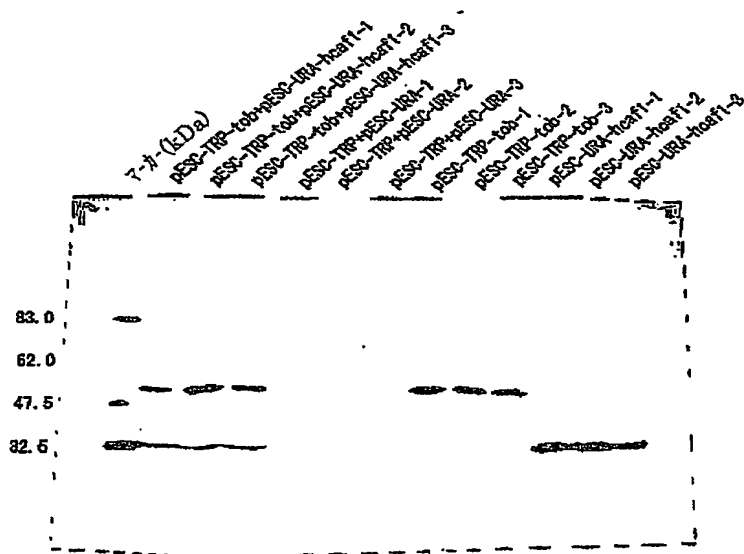


【図 15】



BEST AVAILABLE COPY

【図 16】



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に關与するタンパク質を發現し得、かつ当該發現に伴って生育阻害が生じうる形質転換酵母、当該酵母を用いる生理活性物質のスクリーニング方法、ならびに当該スクリーニング方法により得られうる生理活性物質を提供すること。

【解決手段】

ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に關与するタンパク質またはその断片を發現可能であり、かつ該タンパク質またはその断片の非發現下と比べて發現下に生育阻害が認められる形質転換酵母； a) 前記形質転換酵母と被験試料とを接触させる工程、 b) ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に關与するタンパク質またはその断片を發現しうる条件下に酵母を培養する工程、ならびに c) 酵母の生育状態を測定する工程、を含み、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育状態の回復が認められた場合に該被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する、生理活性物質のスクリーニング方法；ならびに前記スクリーニング方法により得られうる生理活性物質。

【選択図】 なし

特願 2002-260515

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[301009597]

1. 変更年月日

2001年 2月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府富田林市若松町東1丁目9番32号

氏 名

株式会社生物技術研究所